



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



FERNANDA OLIVEIRA BORGES

“A PARTICIPAÇÃO DA VIA NÃO-CANÔNICA DE NF- κ B NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS E SEU EFEITO SOBRE A SINALIZAÇÃO DA
INSULINA EM HEPATÓCITOS”

“THE INVOLVEMENT OF NON-CANONICAL NF- κ B PATHWAY IN THE
INFLAMMATORY RESPONSE OF MACROPHAGES AND ITS EFFECT ON
INSULIN SIGNALING IN HEPATOCYTES”

Limeira
2016

FERNANDA OLIVEIRA BORGES

“A PARTICIPAÇÃO DA VIA NÃO-CANÔNICA DE NF- κ B NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS E SEU EFEITO SOBRE A SINALIZAÇÃO DA
INSULINA EM HEPATÓCITOS”

“THE ROLE OF NON-CANONICAL PATHWAY OF NF- κ B IN THE
INFLAMMATORY RESPONSE OF MACROPHAGES AND THEIR EFFECT ON
INSULIN SIGNALING IN HEPATOCYTES”

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Aplicadas para obtenção do
Título de Mestra em Ciência da Nutrição e
do Esporte e Metabolismo, na Área de
concentração Metabolismo e Biologia
Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni

Coorientador: Dr. Fernando Moreira Simabuco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA FERNANDA OLIVEIRA BORGES, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ADRIANA
SOUZA TORSONI.



Limeira

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/23072-7

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

B644p Borges, Fernanda Oliveira, 1990-
A participação da via não-canônica de NF-kB na resposta inflamatória de macrófagos e seu efeito sobre a sinalização da insulina em hepatócitos / Fernanda Oliveira Borges. – Limeira, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Adriana Souza Torsoni.
Coorientador: Fernando Moreira Simabuco.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Obesidade. 2. Metabolismo. 3. Ácidos graxos. I. Torsoni, Adriana Souza, 1973-. II. Simabuco, Fernando Moreira, 1982-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The involvement of non-canonical NF-kB pathway in the inflammatory response of macrophages and its effect on insulin signaling in hepatocytes

Palavras-chave em inglês:

Obesity
Metabolism
Fatty acids

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Adriana Souza Torsoni [Orientador]
Hosana Gomes Rodrigues
Patrícia da Silva Melo

Data de defesa: 15-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Autora: Fernanda Oliveira Borges

Título: A participação da via não-canônica de NF- κ B na resposta inflamatória de macrófagos e seu efeito sobre a sinalização da insulina em hepatócitos

Natureza: Dissertação de Mestrado

Instituição: Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Ciências Aplicadas

Data da Defesa: Limeira, 15 de julho de 2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Hosana Gomes Rodrigues

Assinatura

Profa. Dra. Patricia da Silva Melo

Assinatura

Dedico esse trabalho aos meus pais, Benedito e Ita, por me ensinarem a importância da perseverança, paciência, confiança; e a minha irmã, Brunna, pelo exemplo de dedicação e coragem.

AGRADECIMENTOS

À minha família: meus pais Benedito Claudio Borges e Ita L. de Oliveira Borges, e minha irmã Brunna Oliveira Borges, pelas lições recebidas de perseverança, confiança e coragem, pelos exemplos de força, educação, carinho e honestidade. Pelo amor incondicional, incentivo, por acreditarem na minha capacidade e, principalmente, pelo apoio as minhas escolhas. Pelos sacrifícios, renúncias e por compreenderem a importância dessa conquista em minha vida. Sendo que a maior marca dessa etapa que vocês deixaram em mim foi a de reconhecer que a beleza de uma família consiste nas suas diferentes formas de ver a vida e que por maiores que sejam as distâncias e as dificuldades, eu sempre poderei voltar para o nosso lar.

Ao meu grande amor e amigo Mateus Miranda Durante que desde o começo despertou em mim um belo e legítimo sentimento: a ânsia em me tornar uma pessoa melhor a cada dia, mais justa, sensata e bondosa, sendo você o maior exemplo disso. Mais do que isso, você sempre soube me auxiliar nos momentos difíceis com gestos e palavras sábias cheias de ternura. Um exemplo de dedicação e companheirismo.

À Prof^a. Dr^a. Adriana Souza Torsoni por ser um exemplo imensurável de competência e profissionalismo. A cada dia a admiro mais por sua conduta não apenas profissional, mas também pessoal. Agradeço por todo o tempo dedicado, pela confiança, atenção, paciência e sabedoria compartilhada, não poderia me esquecer de agradecer as conversas difíceis que tivemos, foram importantes para o meu crescimento, saber orientar é um dom e você tem a minha admiração eterna.

Ao Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni, Prof^a. Dr^a. Marciane Milanski, e Prof. Dr. Fernando Simabuco pela colaboração e por estarem sempre dispostos a ensinar, o que contribuiu imensamente para o meu conhecimento e aprendizado.

À todos os docentes e funcionários da unidade, os quais contribuíram para a minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Distúrbios do Metabolismo da FCA/UNICAMP, que sempre tiveram persistência e permitiram que pudéssemos criar uma família, tornaram a execução do projeto mais fácil e prazerosa. Agradeço em especial os colegas Andressa Reginatto, Camila Mendes, Isadora Pavan, Josiane Miyamoto, Suleyma Costa, Fernando Riback, Isabela Lorizola, Julia Sartori,

Simone Lemes, Mariana Tavares, Mariana Pitton, Tamires Santos, Anelise Souza e Pamela Lanza. As queridas *Drizets*: Thaís de Fantes, Monique Souza, Derly Florindo, Mariana Mancini, Marcela Miracca e Carolina Panzarin. Não podendo esquecer das veteranas: Arine Melo e Rafaela Benatti que hoje não compõe nosso time, mas foram fundamentais no início da minha aprendizagem.

Agradeço imensamente as amigas que a pesquisa e a vida me proporcionaram Laís Simino, Marina Fontana e Mariana Portovedo, sou muito grata por ter vocês no meu dia-a-dia. Sinto-me lisonjeada em notar que vocês se tornaram excelentes pesquisadoras e por poder fazer parte disso, me inspiro em vocês. Obrigada pela parceria, risadas, conversas, comemorações, confidências, colaborações e por partilharem sonhos e angústias. Vocês foram essenciais para a execução e finalização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de auxílio financeiro, acreditando e permitindo a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho:

Muito obrigada!

RESUMO

A obesidade tem adquirido características de epidemia e os mesmos números que indicam o aumento da obesidade também apontam um aumento significativo de indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2. Sabe-se atualmente que ambas as patologias apresentam uma resposta metabólica característica, que leva a uma alteração em vias de sinalização intracelulares e na homeostase da glicose. O uso de dieta hiperlipídica (DH) é responsável pelo aumento da massa adiposa, que entre outros fatores, leva a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. Vários estudos apontam para a participação de macrófagos nesse processo. A via não-canônica de sinalização de NF- κ B contribui para o quadro de inflamação e pode representar uma via chave na resposta metabólica à obesidade, especialmente na resistência à insulina. Nosso intuito foi avaliar se a sobrecarga nutricional induziria polarização macrofágica em tecidos metabólicos, ocasionando aumento na expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, induzindo não somente o quadro inflamatório, mas a resistência ao sinal da insulina em hepatócitos. Para isso, macrófagos de camundongo (RAW 264.7) foram submetidos ao bloqueio de NIK por siRNA, desafiados com palmitato e, posteriormente, o meio condicionado proveniente destas células foi adicionado como meio de manutenção em células de hepatoma de camundongo (Hepa1c1c7). Os resultados mostraram que o palmitato é capaz de induzir uma resposta inflamatória em macrófagos ocasionando resistência ao sinal da insulina em hepatócitos, por intermédio da ativação de NIK, através da degradação de TRAF-3 em células imunes. Ao bloquear NIK em células RAW 264.7 o quadro inflamatório foi reduzido, mesmo após exposição ao palmitato, e o quadro de resistência ao sinal da insulina em hepatócitos tratados com o meio condicionado de macrófagos foi amenizado. O estudo sugere uma comunicação entre hepatócitos e macrófagos residentes no fígado no desenvolvimento da resistência à insulina por intermédio da via não-canônica de NF- κ B.

ABSTRACT

The obesity has acquired epidemic characteristics and the same numbers that indicate the increase in obesity also showed a significant increase in individuals with diabetes mellitus type 2. It is now known that both diseases exhibit a metabolic response characteristic, which leads to changes in intracellular signaling pathways and glucose homeostasis. High fat diet (HFD) consumption is responsible for the increased fat mass leading to an increased production of pro-inflammatory cytokines. Several studies indicate the involvement of macrophages in this process. The non-canonical NF- κ B pathway contributes to the pro-inflammatory signaling activation, and may represent a key metabolic pathway in response to obesity, especially in insulin resistance. Our aim was to evaluate if the nutritional overload trigger macrophage polarization in metabolic tissues, resulting in an increase in the gene expression of proinflammatory cytokines, inducing not only the inflammatory condition, but the resistance to the insulin signal in hepatocytes. Mouse macrophage cell line (RAW 264.7) were treated with NIK siRNA, and challenged with palmitate. Macrophage-conditioned medium was used to treat hepatocytes (Hepa1c1c7). Our results showed that palmitate was able to induce an inflammatory response in macrophages leading to insulin resistance in hepatocytes, through NIK activation by TRAF-3 degradation in immune cells. NIK knockdown in macrophages reduced the pro-inflammatory profile induced by palmitate treatment, and ameliorated insulin resistance in hepatocytes treated with macrophage-conditioned medium. Therefore, the present study suggests the communication between hepatocytes and macrophages in the liver on development of insulin resistance through non-canonical NF- κ B pathway.

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinase B
AP-1	Ativador de proteína 1
BMDM	<i>Bone marrow-derived macrophages</i>
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
FOXO1	<i>Forkhead box protein 01</i>
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
G6Pase	Glicose 6- Fosfatase
GSK-3 α	Glicogênio Sintase Quinase 3 α
IKK	Quinase do inibidor kappa B
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IR	Receptor de Insulina
IRS-1	Substrato do Receptor de Insulina 1
JNK	Quinase c-Jun N-Terminal
LPS	Lipopolissacarídeo
NF-KB	Fator nuclear kappa B
NIK	Quinase Indutora de NF- κ B
PDK1	Piruvato desidrogenase quinase isoenzima 1
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TRAF	Fator de associação a receptores do tipo TNF- α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	ARTIGO.....	21
4	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

A obesidade afeta hoje um grande número de indivíduos em todo o mundo, sem distinção de idade, gênero e nível sócio-econômico-cultural (POPKIN; ADAIR; NG, 2012), sendo considerada um dos mais graves problemas de saúde pública do século XXI (BARNES; OPITZ; GILBERT-BARNES, 2007).

Em grande parte do mundo contemporâneo, particularmente na sociedade ocidental, a obesidade é considerada um estigma social, embora ao longo da História tenha sido vista como símbolo de riqueza e fertilidade (HASLAM; JAMES, 2005). Na antiguidade, os gregos foram a primeira civilização a perceber os perigos da obesidade e a sua associação com outras patologias. O grego Hipócrates, conhecido como pai da medicina ocidental, realizou comparações importantes acerca da alimentação de indivíduos saudáveis e enfermos, dando um grande passo para compreender a relação entre a alimentação e a obesidade (GRAMMATICOS; DIAMANTIS, 2008; HASLAM, 2007).

A Organização Mundial da Saúde aponta que a prevalência de obesidade no mundo mais do que duplicou desde 1980 e atualmente mais de 1,9 bilhão de adultos (39%) estão acima do peso, sendo que destes, mais de 600 milhões são considerados obesos (13%) (WHO, 2016).

No Brasil, segundo dados da VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), obtidos pelo Ministério da Saúde em 2015, o número de indivíduos com obesidade manteve-se estável desde 2006, porém, com sobrepeso permanece em ascensão, passando de 43% para 52,5% da população em um período de nove anos (VIGITEL, 2015).

O sobrepeso e a obesidade se desenvolvem devido a um desequilíbrio energético, que culmina em excesso de energia armazenado na forma de tecido adiposo branco (CANNON, 2004; GALGANI; RAVUSSIN, 2008). As causas desta patologia são multifatoriais e diversos grupos de pesquisa têm tentado explicar os fatores primordiais da gênese da obesidade. A literatura aponta que mais de 95% dos casos de obesidade são decorrentes de uma combinação complexa de fatores genéticos e ambientais, uma vez que defeitos monogênicos contribuem com menos de 5% de todos os casos de obesidade severa (RANADIVE; VAISSE, 2008).

Dentre os fatores ambientais, a sobrecarga nutricional parece ser um dos principais elementos que predispõe o desenvolvimento da doença (GALGANI; RAVUSSIN, 2008). Nas últimas décadas, ocorreu uma importante mudança no padrão alimentar populacional denominada “Transição Nutricional”, na qual a economia capitalista teve papel importante, causando impacto na qualidade alimentar e acarretando em um amplo consumo de alimentos ricos em carboidratos simples e refinados, redução no consumo de carboidratos complexos e fibras e, principalmente, um consumo demasiado de gorduras, principalmente saturadas, na alimentação cotidiana (BELAHSEN, 2014; POPKIN, 2001).

O acúmulo anormal de tecido adiposo na obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas, tais como hipertensão, doenças cardiovasculares, esteatose hepática e diabetes (ABALLAY et al., 2013; NASSIR et al., 2015). As doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) são consideradas patologias de causas evitáveis, responsáveis por alta taxa de mortalidade na população (BARNESS; OPITZ; GILBERT-BARNESS, 2007). Segundo dados da VIGITEL (2015), no Brasil, cerca de 72% dos óbitos são decorrentes de DCNT.

Os estudos sobre a relação entre excesso de peso e diabetes *melittus* tipo 2 iniciaram-se na década de 90. Em 1993, um grupo de pesquisadores publicou o primeiro estudo experimental que demonstrou a relação entre o estado inflamatório presente na obesidade e o desenvolvimento da resistência ao sinal da insulina. Os autores encontraram altos níveis de uma citocina pró-inflamatória importante, denominada fator de necrose tumoral- α (TNF- α), no tecido adiposo de animais geneticamente obesos. Ao neutralizarem esta citocina *in vivo*, em animais obesos e diabéticos, houve uma maior taxa de utilização periférica de glicose após injeções de insulina (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993).

Dois anos depois pesquisadores de Harvard publicaram o primeiro estudo epidemiológico em humanos correlacionando a alta incidência de diabetes em mulheres obesas (COLDITZ et al., 1995).

Diante desses resultados, diversos estudos foram realizados a fim de compreender qual o efeito do estado inflamatório crônico e de baixo grau presente no quadro de obesidade nas diversas desordens moleculares e metabólicas, principalmente na resistência ao sinal da insulina. Modelos atuais propõe que as

células do sistema imunológico são essenciais neste processo (HOTAMISLIGIL, 2006a; TATEYA; KIM; TAMORI, 2013).

A insulina é um hormônio anabólico com efeitos metabólicos potentes, essencialmente conhecido por manter a homeostase da glicose, que atua em células responsivas a este hormônio, como hepatócitos, adipócitos e células musculares. Em situação basal, a via de sinalização da insulina inicia-se quando o hormônio liga-se ao seu receptor transmembranar (IR), uma glicoproteína heterotetramérica com atividade quinase intrínseca, composto de duas subunidades α e duas β . A subunidade α contém o sítio de ligação para a insulina, já a β é responsável pela propagação intracelular do sinal e possui a capacidade de autofosforilação e fosforilação de outros substratos em aminoácidos tirosina (MYERS; WHITE, 1996). Por conseguinte, os substratos do receptor de insulina (IRS) são fosforilados em tirosina, criando sítios de reconhecimento para a fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K). PI3K desencadeia a ativação de diversas proteínas citoplasmáticas como a piruvato desidrogenase quinase isoenzima 1 (PDK1), que fosforila e ativa a proteína quinase B (AKT) (SUN et al., 1992).

A AKT é uma serina/treonina quinase que desencadeia diversas funções metabólicas, como, por exemplo, a captação de glicose em tecidos como músculo e adiposo, através da ativação da translocação do transportador GLUT4 para a membrana celular (CONG et al., 1997). Nos hepatócitos, porém, a ligação de insulina ao seu receptor medeia dois eventos importantes, i) a inibição da gliconeogênese e ii) a intensificação da síntese de glicogênio. O bloqueio da gliconeogênese ocorre quando AKT migra para o núcleo e fosforila FOXO1, induzindo sua translocação para o citoplasma e impedindo sua atuação como fator de transcrição, fato que, conseqüentemente, bloqueia a sua função de estimular a expressão das enzimas gliconeogênicas fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) (MATSUMOTO et al., 2006). Em contrapartida, a síntese de glicogênio é ativada pela AKT, pois ela fosforila e inibe a enzima glicogênio sintase quinase-3 (GSK3), uma importante proteína que fosforila e inibe a enzima glicogênio sintase (MATSUMOTO et al., 2006).

Estímulos obesogênicos e/ou inflamatórios são capazes de ativar importantes receptores da resposta imune inata, como o *toll like receptor 4* (TLR4) e o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), importantes mediadores da resistência ao sinal da insulina. Um componente presente na parede de bactérias

gram-negativas, denominado lipopolissacarídeo (LPS), assim como ácidos graxos saturados de cadeia longa, são capazes de ativar TLR4, o qual está presente em diferentes tecidos, tais como o fígado e o tecido adiposo. Uma vez ativo, este receptor inicia uma cascata de sinalização intracelular que ativa mecanismos para combater o patógeno e, desta forma, proteínas quinase c-Jun N-Terminal (JNK) e I κ B quinase (IKK), que possuem atividade serina quinase, podem ser ativadas, induzindo a ativação de genes inflamatórios que liberam quimioatrativos responsáveis por recrutar macrófagos com o intuito de ativar o sistema imune. JNK é responsável por induzir a ativação do fator de transcrição ativador de proteína 1 (AP-1), que, por sua vez, estimula a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α . Já IKK é responsável por ativar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que estimula a expressão de diversas outras citocinas, tais como IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α (VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015). Essas citocinas podem ativar TNFR e outros receptores de membrana para citocinas pró-inflamatórias, retroalimentando, assim, a sinalização inflamatória e, consequentemente, perpetuando seus efeitos.

Além disso, JNK, IKK e outras proteínas, como PKC θ , podem exercer uma segunda função quando ativas: interagir com proteínas da via da sinalização da insulina. Neste caso, sua ação consiste em mediar a fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina no resíduo de serina 307, um sítio de fosforilação que interrompe a interação entre o domínio de ligação de fosfotirosina do IRS1 (PTB) com o receptor de insulina ativo (fosforilado em tirosina), impedindo a propagação do sinal. Este evento ocorre a fim de interromper o suprimento energético da célula infectada para impedir a replicação do patógeno (AGUIRRE et al., 2000, 2002; VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015). Dessa maneira, em condições de resistência à insulina, AKT não é mais fosforilada, ocasionando bloqueio da síntese de glicogênio e aumento da expressão de enzimas gliconeogênicas, fatores que contribuem para a hiperglicemia em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (SOUMAYA, 2012).

Adicionalmente, um elegante estudo demonstrou que animais submetidos à dieta hiperlipídica e *knockouts* para JNK em macrófagos apresentavam fenótipo obeso, mas os mesmos permaneciam sensíveis à ação da insulina. Essa proteção ao desenvolvimento de resistência à insulina foi associada à diminuição da

infiltração de macrófagos nos tecidos periféricos, mostrando que a ativação de JNK é necessária para a polarização macrofágica pró-inflamatória (HAN et al., 2013).

O NF- κ B representa uma família de fatores de transcrição que, além de regular diversos processos biológicos, tais como iniciação e propagação da resposta imune inata e adaptativa, crescimento celular, desenvolvimento e sobrevivência, atua como proteína integradora de sinais pró-inflamatórios. Em mamíferos, a família do NF- κ B é composta por cinco membros: RelA (também chamado de p65), RelB, c-REL, NF- κ B1 p50 e NF- κ B2 p52, que se associam e formam complexos diméricos passíveis de induzir a transcrição de diversos genes (HAYDEN; GHOSH, 2008; RAZANI; REICHARDT; CHENG, 2011). Esses dímeros normalmente estão retidos no citoplasma pela associação com proteínas inibitórias (I κ Bs), que previnem sua translocação nuclear e ativação transcricional. NF- κ B1 e NF- κ B2 são traduzidos como proteínas precursoras, p105 e p100. O processamento de p105 e p100 é mediado pelo proteassoma e gera as proteínas maduras, p50 e p52, mas também rompe a ligação dos precursores com as proteínas inibitórias, resultando na translocação de membros NF- κ B para o núcleo (SUN; LEY, 2008; XIAO; HARHAJ; SUN, 2001) .

A via de sinalização canônica de NF- κ B é considerada como a via central de regulação da resposta inflamatória em situações fisiológicas e tem sido extensivamente estudada no contexto de desordens metabólicas, incluindo a obesidade. No entanto, apenas recentemente, tem crescido o número de estudos voltados a compreender os detalhes moleculares da via não-canônica de sinalização de NF- κ B e seu envolvimento com o desenvolvimento de patologias (CILDIR; LOW; TERGAONKAR, 2016).

A via de sinalização que medeia a ativação de NF- κ B pode ser diferenciada em clássica (ou canônica) e alternativa (ou não canônica). A via clássica responde a vários estímulos, como ligantes para receptores antigênicos, receptores de citocinas, receptores de reconhecimento padrão, como TLRs, dentre outros e baseia-se na degradação de I κ Bs, particularmente I κ B α . Os diferentes sinais convergem para o complexo trimérico IKK (I κ B kinase), composto de duas subunidades catalíticas (IKK α and IKK β) e uma regulatória (IKK γ , também conhecida como NEMO). Em sua forma ativa, IKK fosforila I κ B α em dois resíduos de serina N-terminais, disparando sua ubiquitinação e degradação pelo proteassoma. Isso leva à

liberação e translocação do complexo NF- κ B, predominantemente dos dímeros p50/RelA para o núcleo (SENFTLEBEN et al., 2001; SUN; LEY, 2008).

Em contraste à via canônica de NF- κ B, que responde a diferentes sinais oriundos de diferentes receptores, a via não-canônica de NF- κ B é alvo de um conjunto específico de receptores, o subconjunto de membros da família de TNFR. A ativação da via não canônica de NF- κ B envolve diferentes moléculas de sinalização e leva à ativação, predominantemente, do dímero p52/RelB (Figura 1). Essa via é baseada no processamento da proteína p100 e, em contraste ao processamento constitutivo e co-traducional de p105, o processamento de p100 é um evento induzido e pós-traducional. Uma vez que p100 interage preferencialmente com RelB, o processamento de p100 não somente gera p52, mas também causa translocação nuclear de p52/RelB, levando à ativação gênica (SUN, 2012).

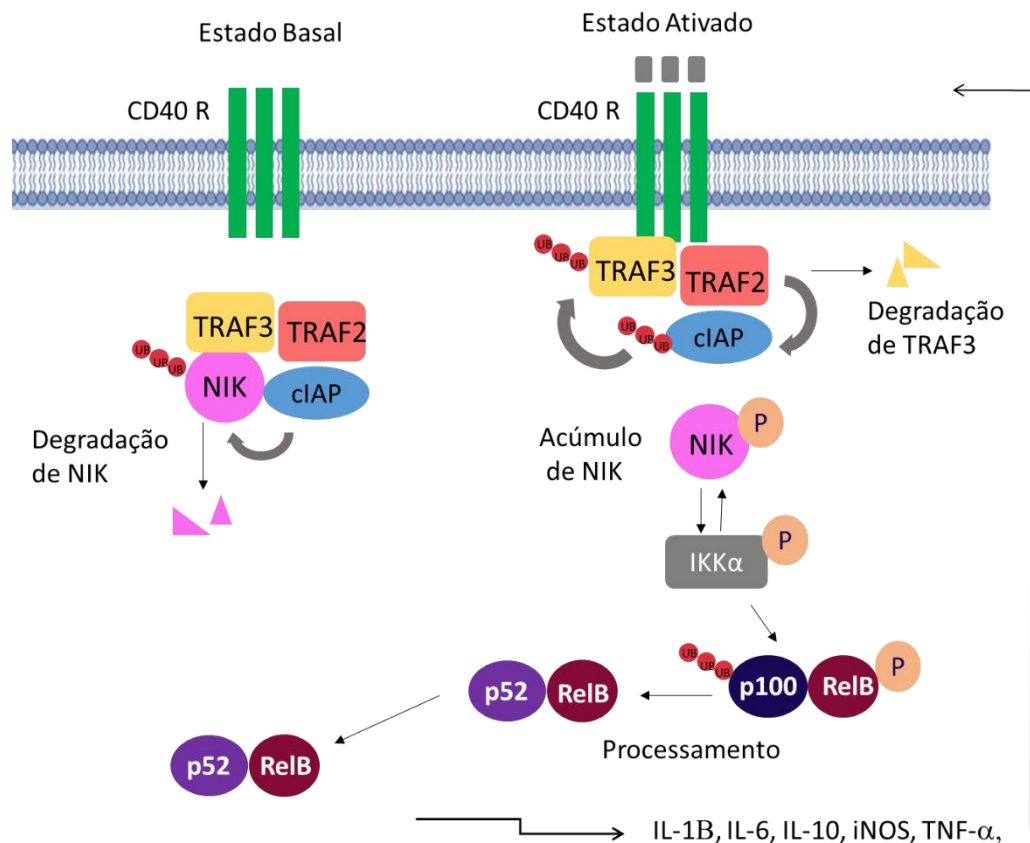


Figura 1: Via de sinalização não-canônica de NF- κ B (Adaptado de RAZANI; REICHARDT; CHENG, 2011).

O primeiro componente identificado da via não-canônica de NF- κ B foi a quinase indutora de NF- κ B (NIK), uma proteína central da via e membro das MAP3 quinase, que foi originalmente descrita como responsável por ativar NF- κ B através do seu receptor de TNF- α (TNFR) (MALININ et al., 1997). NIK também é essencial para o processamento de p100. A região C-terminal de p-100 é chamada de domínio responsivo à NIK e possui dois resíduos de serina, S866 e S870, que se assemelham ao sítio de fosforilação de I κ B α . Mutações em alguma dessas serinas impedem completamente o processamento de p100 (LIANG; ZHANG; SUN, 2006; XIAO; HARHAJ; SUN, 2001). Apesar de ser uma proteína sintetizada continuamente, sua presença não pode ser detectada em situações normais na célula, devido à sua degradação constitutiva (QING; QU; XIAO, 2005). Quando a via não canônica de NF- κ B é ativada, a degradação constitutiva de NIK é inibida, levando ao acúmulo desta proteína e ocasionando sua autofosforilação e ativação, permitindo que ela fosforile e ative IKK α e dê início à fosforilação e marcação de p100, que, por sua vez, resulta em digestão proteassomal parcial de p100. Em seguida, há a liberação da região N-terminal (p52), que é complexada com RelB e, desta forma, é liberada para translocar-se para o núcleo. IKK α , em sua forma ativa, também fosforila NIK, desestabilizando-a e limitando a ativação de eventos posteriores (RAZANI; REICHARDT; CHENG, 2011; SUN, 2012; ZARNEGAR et al., 2008a).

Existem, ainda, alguns outros fatores críticos para a regulação de NIK na via não canônica de NF- κ B. Os receptores da família TNFR medeiam papéis biológicos específicos, através do recrutamento de uma ou mais moléculas da família de fatores de associação a TNFR (TRAFs), composta de 6 membros. Especificamente, os membros TRAF2 e TRAF3 são de extrema importância. Estudos genéticos e de superexpressão mostraram a participação de TRAF2, TRAF5 e TRAF6 na ativação da via canônica de NF- κ B (BISHOP; XIE, 2007; ROTHE et al., 1995; SUN, 2010). TRAF2 parece mediar não somente a ativação da via canônica de NF- κ B, mas também a não canônica, além da via de sinalização da JNK induzida por estresse de retículo endoplasmático, apontada como um importante mecanismo para o desenvolvimento da resistência à insulina e progressão de DM2 (NAPOLITANO; KARIN, 2010; ZARNEGAR et al., 2008b).

O outro fator de associação a TNFR, TRAF3, é reconhecido como supressor da via não canônica de NF- κ B, pois parece atuar em conjunto com TRAF2 na regulação negativa desta via (VALLABHAPURAPU et al., 2008). TRAF3 foi identificado também como um componente importante da via de sinalização do TLR, um vez que se associa a MyD88 e parece ser essencial para a produção de IFN tipo I e IL-10 induzida por TLR em macrófagos. Células deficientes em TRAF3 produzem baixos níveis de IFN tipo I e IL-10 e níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-12 (ZARNEGAR et al., 2008a).

Em condições basais, TRAF3 é encontrada associada à NIK, interagindo com TRAF2 associada a cIAP. A interação NIK-cIAP resulta em ubiquitinação persistente de NIK e constitutiva degradação proteassomal em células não estimuladas. O estímulo de um receptor induz aumento da atividade de ubiquitin-ligase de TRAF2, que conduz à ubiquitinação de cIAP, aumentando a atividade de ubiquitina ligase de cIAP para TRAF3. Isto resulta na poliubiquitinação e degradação de TRAF3 e, em menor grau, de TRAF2. Uma vez que a concentração de TRAF3 atinge um determinado limiar, NIK recém-sintetizada deixa de se associar com o complexo TRAF2-cIAP e não é mais dirigida para a degradação. Sendo assim, o acúmulo de NIK resulta na ativação da via alternativa de NF- κ B pelo dímero p52-RelB (CILDIR; LOW; TERGAONKAR, 2016; RAZANI; REICHARDT; CHENG, 2011).

Entretanto, animais *knockout* para TRAF2 no fígado, quando desafiados com estímulo inflamatório como dieta hiperlipídica, não apresentam alteração na sinalização da insulina (Chen, Sheng et al. 2012). Neste estudo, os autores observaram diminuição da insulinemia e produção hepática de glicose, devido ao prejuízo na sinalização mediada pelo glucagon. Além disso, a deleção dessa proteína em hepatócitos não altera a resposta inflamatória hepática, mostrando que, sob condições de supernutrição, a via da TRAF2 não é responsável por mediar a inflamação hepática induzida por dieta, sugerindo que TRAF2 seja capaz de regular separadamente a resposta imune e a resposta metabólica, em células hepáticas, através de vias independentes (Chen, Sheng et al. 2012; Sheng, Zhou et al. 2012).

Acredita-se que o quadro de inflamação crônica subclínica observado na obesidade, decorrente de um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias em tecidos metabólicos, aliado à infiltração macrofágica, contribui sobremaneira para o estabelecimento da resistência ao sinal da insulina. A ativação de vias

intracelulares, como a via da JNK e as vias canônica e não-canônica de NF- κ B em tecidos periféricos, parecem participar dessa desordem. Em especial, a via não-canônica de NF- κ B, uma via ainda pouco estudada em modelos de inflamação induzida por sobrecarga nutricional, mostrou ser dependente da ativação de NIK.

Sendo assim, sabendo que o fígado é um importante órgão responsivo à inflamação induzida por sobrecarga nutricional, nosso interesse foi investigar se o bloqueio da via não-canônica de NF- κ B em macrófagos poderia proteger este tecido do desenvolvimento de resistência à insulina.

Nossa hipótese foi a de que a sobrecarga nutricional leva à polarização macrofágica em tecidos metabólicos e ativação de NIK, através do bloqueio de TRAF-3 em células imunes, como células de Kupffer, ocasionando um aumento na expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, induzindo tanto um quadro inflamatório subclínico, como também a resistência ao sinal da insulina em hepatócitos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar a repercussão da modulação da proteína NIK em macrófagos, induzida por palmitato, sobre a resistência à insulina em hepatócitos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão e/ou fosforilação de proteínas envolvidas com a progressão e o bloqueio do sinal da insulina em hepatócitos cultivados *in vitro*, tratados com meio condicionado, proveniente da exposição de células de linhagem de macrófagos ao ácido palmítico.
- Avaliar o efeito da inibição de NIK em linhagem de macrófagos tratados com ácido palmítico sobre a expressão e/ou fosforilação de proteínas envolvidas com a progressão e o bloqueio do sinal da insulina em hepatócitos tratados com meio condicionado dos macrófagos.

3 ARTIGO

The role of non-canonical NF κ B pathway of immune cells on insulin resistance development in hepatocytes

Borges, FO, Simino, LAP, Portovedo, M, Fontana, MF, Simabuco, F.M. Milanski, M, Torsoni, MA, Torsoni, AS.

Laboratory of Metabolic Disorders, Faculty of Applied Sciences, University of Campinas -UNICAMP, Limeira, São Paulo, Brazil

** Corresponding author:*

Adriana S. Torsoni

Faculdade de Ciências Aplicadas - Universidade de Campinas

Rua Pedro Zaccaria, 1300 - Jardim Santa Luiza

Limeira - São Paulo - Brasil

CEP: 13484-350

Phone: 55 19 3701 6705

E-mail: adriana.torsoni@fca.unicamp.br

Abstract

Obesity has acquired epidemic characteristics as well as diseases associated such as type 2 diabetes. It is now known that both diseases exhibit a metabolic response characteristic, which leads to changes in intracellular signaling pathways and glucose homeostasis. Dietary fats and obesity are responsible for the increased production of pro-inflammatory cytokines. Several studies have shown the involvement of macrophages in this process. The non-canonical NF κ B pathway participates of the pro-inflammatory signaling activation and can be associated to insulin resistance development in the obesity. We tested the hypothesis that lipid overload trigger macrophage polarization in metabolic tissues (such as liver) and activation of NF κ B inducing kinase (NIK), a central molecule in non-canonical NF κ B pathway, by

blocking of TRAF-3 on immune cells (such as Kupffer cells), increasing pro-inflammatory cytokines expression and insulin resistance in hepatocytes. Macrophage inflammation induced by treatment with palmitate triggered NIK activation evaluated by TRAF3 degradation. Conditioned medium derived from macrophages palmitate-stimulated reduced IRS1 and AKT phosphorylation in hepatocytes stimulated by insulin. NIK macrophage-specific blockage by siRNA reversed insulin resistance in hepatocytes. In summary our results showed the importance of NIK in the crosstalk between immune cells and hepatocytes in the development of insulin resistance driving liver disease progression.

Key words: NF κ B inducing kinase, insulin resistance, dietary fat, obesity, liver.

Acknowledgments

The present study was supported by grant #2013/23072-7 and #2013/07607-8, São Paulo Research Foundation (FAPESP). Laboratory of Metabolic Disorders belongs to the Obesity and Comorbidities Research Center (OCRC).

Introduction

The discovery that obesity itself can result in a low-grade systemic inflammation, named metaflammation in 2006 by Gokhan Hotamisligil (HOTAMISLIGIL, 2006b), opened an important field to understanding the association of nutritional overload with insulin resistance and others co-morbidities.

The consumption of dietary fats and obesity result in increased blood levels of free fatty acids (FFAs) (BODEN, 2011) that trigger activation of TLR4 signaling (VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015) and family members of TNFR in macrophages residents and/or infiltrated in metabolically relevant tissues (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008; WEISBERG et al., 2006). This result in several alterations mediated by pro-inflammatory cytokines, such as inhibition of the insulin signaling cascade (SONG et al., 2006).

Insulin resistance is characterized by serine/threonine inhibitory phosphorylation of IRS1 by JNK and/or IKK but also by other kinases such as PKR and protein kinase C θ (PKC θ) leading to impairment of insulin signaling. Reduction in insulin signaling affects other aspects of liver metabolism such as the ability to control gluconeogenesis and glycogen storage(GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

Specifically in obese liver activation of the NF κ B pathway appears to be critical in inflammation-induced insulin resistance(CAI et al., 2005).

The signaling pathway that mediates NF κ B activation may be differentiated in canonical and non-canonical. The canonical pathway responds to various stimuli such as antigenic ligands receptors, cytokine receptors and innate immune system receptors that respond to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The signaling converges to IKK complex (I κ B kinase) activation and I κ B α phosphorylation, triggering its ubiquitination and degradation by proteasome. This leads to the release and translocation of NF κ B complex, predominantly dimers p50/RelA and p50/c-Rel, to the nucleus (JIANG et al., 2003; SENFTLEBEN et al., 2001; ZARNEGAR et al., 2008a).

The alternative activation of the NF κ B (non-canonical pathway) involves different signaling molecules and leads to the activation of p52/RelB dimer(SUN, 2012). NF κ B inducing kinase (NIK) is a central element in the non-canonical NF κ B pathway. Although NIK has been described to be expressed ubiquitously, it is not detected in physiological conditions due to its constitutive degradation(LIAO et al., 2004; QING; QU; XIAO, 2005; SAITOH et al., 2008). However, NIK degradation is inhibited when the non-canonical NF κ B pathway is activated, leading to NIK accumulation and stabilization.

Factors associated with the TNF type receptors (TRAFs) are critical in negative regulation of NIK. TRAF3, a recognized suppressor of non-canonical NF κ B pathway, is associated to NIK, interacting with TRAF2 and cIAP ubiquitin ligase(VALLABHAPURAPU et al., 2008). NIK-cIAP interaction results in persistent ubiquitination of NIK and constitutive proteasomal degradation. However, oxidative stress, saturated fatty acids, endotoxins, and cytokines increase ubiquitin ligase activity of TRAF2, which leads to ubiquitination cIAP. This results in TRAF3 polyubiquitination and degradation leading to NIK activation(FAGARASAN et al.,

2000; FAN et al., 2009; HABIB et al., 2001; LIAO et al., 2004; PARK et al., 2006; SHENG et al., 2012; SUN, 2011; THU; RICHMOND, 2010; VALLABHAPURAPU et al., 2008; ZARNEGAR et al., 2008b). NIK phosphorylates and activates IKK α , initiating processing of p100 and release of p52 which forms a complex with Rel B and translocate to the nucleus(LIAO et al., 2004; RAZANI; REICHARDT; CHENG, 2011; SUN, 2012; VINCE et al., 2007; ZARNEGAR et al., 2008a).

In this context the non-canonical NF κ B pathway contributes to the pro-inflammatory signaling activation and may participate of insulin resistance development in the obesity.

In the present study we tested the hypothesis that the nutritional overload trigger macrophage polarization in metabolic tissues, such as liver, and activation of NIK by blocking of TRAF-3 on immune cells, resulting in an increase in pro-inflammatory cytokines expression and development of insulin resistance in neighborhood hepatocytes, as result of crosstalk between cells in tissue.

Methods

Cell Culture

Murine RAW 264.7 macrophage cell line was kindly provided by Prof. Dr. Licio Augusto Velloso (*Laboratory of Cell Signaling* - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil). Cells were maintained in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium; Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum; Sigma-Aldrich), 100U/mL penicillin and 0,1mg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific), and incubated at 37⁰C in 5% CO₂.

Mouse hepatocyte cell line Hepa1c1c7 was purchased from BCRJ (Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil). Cells were grown in α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle without nucleosides - Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich), 100U/mL penicillin and 0,1 mg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific), and incubated at 37⁰C in 5% CO₂.

For both cell line experiments were performed between 5 and 40 passages.

Cell Treatment

Macrophage cell line (RAW 264.7) was grown as monolayers at a density of 4×10^5 cells/mL. Two days after seeding, the cultured RAW were randomly divided into the following four groups and treatments: control group (Palmitate vehicle- NaOH+BSA 3:1), Palmitate 250 μ M (P250 μ M), Palmitate 500 μ M (P500 μ M), Palmitate 1000 μ M (P1000 μ M). Palmitate+H₂O₂+TNF- α (P100 μ M + H₂O₂100nM +TNF- α 10ng/mL) was used as a positive control for some evaluation. Drugs were added directly to the culture for 3 h in DMEM without FBS and the medium was renewed for 12 hours. Conditioned medium was stored for hepatocytes treatment.

Hepatocyte cell line (Hepa1c1c7) was grown as monolayers at a density of 4×10^5 cells/mL. Two days after seeding, the cultured Hepa were randomly treated with conditioned medium from macrophages for 3, 6 and 12 hours. Cells were challenged with insulin (100nM) for 10 min for insulin resistance evaluation.

Protein Extraction and Immunoblotting

Cells were homogenized in lysis buffer (NaCl 150mM; Trizma base 50mM; 1% SDS; 0,1% NP40; NaF 10mM; Orthovanadate Sodium 10Mm e PSMF 2mM) using a sonicator (SONICS Vibra Cells Newtown, CT. U.S.A.). Solubilized proteins were collected after centrifugation for 10 minutes at 12.000 x G at 4°C. The protein concentration of each sample was quantified by using the BCA protein assay kit. Polyacrylamide gels (12 %) were used to resolve proteins, then electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (Biorad). The nonspecific proteins on membranes were blocked with 5 % non-fat dried milk for 2 h at room temperature. Membranes were incubated with 2 μ g/mL primary antibodies at 4°C, followed by 1 hour incubation of horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at room temperature (KPL, Gaithersburg, MD, USA). Bands were detected by chemiluminescence and quantified by densitometry using ImageJ software. Antibodies against pAKT (sc7985R- pSer473), total AKT (sc8312), pIRS-1 (sc17200- pTyr989), G6Pase (sc25840), pGSK3 α (sc81497), β Tubulina (sc9104), TRAF3 (sc-6933), NIK (sc-7211) were obtain from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA and β -Actina (ab8227) from AbCam, Cambridge, MA, USA.

Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from macrophages cell line using TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations and quantified using NanoDrop ND-2000 (Thermo Electron, WI, USA). Reverse transcription was performed with 3 ng of total RNA, using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies). Relative expression was determined using a TaqMan detection system and primers for the target genes: TNF- α (catalog no. Rn99999017_m1 Applied Biosystems, Life Technologies), IL1 β (catalog no. Rn00580432_m1 Applied Biosystems, Life Technologies). Expression levels were normalized to the housekeeping gene β -actin (catalog no. 4352341E - Applied Biosystems, Life Technologies). Each PCR contained 20 ng of complementary DNA. Real-time PCR was performed on an ABI Prism 7500 Fast platform. Data were analyzed using the sequence detection system 2.0.5 (Life Technologies Corporation, CA, USA) and expressed as relative values determined by the comparative threshold cycle (Ct) method ($2^{-\Delta Ct}$) according to the manufacturer's recommendation.

Enzymatic Immunoassay

TNF- α content in the conditioned medium from macrophage cell line RAW 264.7 was measured on at least four samples from each group using the commercial kit Elisa MAXTM Deluxe Sets, mouse TNF- α (Biolegend), according to the manufacturer's instruction.

TNF- α content Absorbance at 450 nm and 570 nm was measured using *EonTM Microplate Spectrophotometer* (Winooski, VT, USA). TNF- α content was then calculated based on a standard curve of TNF- α solution.

MTT assay

Macrophages RAW 264.7 (1.7×10^5 cells/mL) were seeded in 96-well culture plates, in triplicate. After 24 h cells received the treatments with NaOH+BSA (control) or palmitate as described above. Cells were washed three times with PBS, then incubated with 10 μ L of the stock solution (12 mM) of MTT salt for 3h. The supernatant was aspirated and 100 μ L of HCl 1N: isopropanol 1:25 solution was used to dissolve formazan crystals. Sample absorbance at 570nm was measured in

spectrophotometer - *Eon™ Microplate Spectrophotometer* (Winooski, VT, USA) as specified by the supplier.

siRNA Transfection

RAW 264.7 (70 % confluent) were treated according to the manufacturer's instructions with 10 pmol/μL NIK short interfering RNAs (siRNAs) (Ambion – Life Technologies, Austin, TX) and respective negative control short-hairpin RNA sequence (Ambion – Life Technologies, Austin, TX) using Lipofectamine RNAi Max Reagent (Life Technologies), for 36h to inhibit NIK expression. Transfected cells were confirmed by Western blot analysis of TRAF3 protein expression.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean values \pm SEM. Student's unpaired t-tests were used to compare the differences between two groups. For three or more groups One-Way or Two-Way ANOVA was performed. Bonferroni's was used as post-hoc test and $p < 0.05$ was considered statistically significant using GraphPad Prism5 software (GraphPad Software Inc, USA).

Results

Non-canonical NFκB pathway contributes to inflammation triggered by palmitate in macrophages

Macrophage inflammation was induced by treatment of cell line RAW 264.7 with palmitate. Firstly, in order to determinate the highest concentration that causes the lowest effect on cell viability, a dose response protocol was performed in cell line RAW 264.7. We observed that 250μM and 500μM of palmitate showed similar effect on the cell viability (Fig. 1A). As can be observed in the Fig. 1B and 1C, after 3 and 12hs of exposition to 250μM and 500μM of palmitate the $TNF-\alpha$ levels increased significantly (Fig. 1B-C). Palmitate (500μM) treatment markedly increased (more than 3-fold) mRNA levels of $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ (Fig. 1D-E). Since endogenous *NIK* protein is undetectable by commercial antibodies, we estimated *NIK* activation by examining *TRAF3* amounts (Fig. 1F). Total *TRAF3* was reduced (40%) after macrophages exposition (3hs) to 500μM palmitate. These data suggest that upon macrophage

activation non-canonical NF κ B pathway contributes to inflammation in macrophages challenged by lipid overload.

Pro-inflammatory cytokines secreted by macrophages under lipid overload mediate insulin resistance in hepatocytes

To examine the effect of *NIK* macrophage-specific activation on insulin signal transduction we incubated hepatocytes cell line with palmitate-containing medium from RAW 264.7 cells. Initially, were treated RAW 264.7 cells with palmitate 500 μ M for 3h. Palmitate-containing medium was replaced with fresh medium, and macrophage-conditioned medium was collected 12h later. Hepa 1c1c7 cells were stimulated with insulin (100nM) for 10 min after exposition to conditioned medium derived from macrophages palmitate-stimulated for different periods (3, 6 and 12h). In control cells insulin robustly stimulated phosphorylation of *IRS1* (pTyr989) and *Akt* (pSer473). However, conditioned medium derived from macrophages palmitate-stimulated reduced insulin-stimulated phosphorylation of *IRS1* and *Akt* (Fig 2 A-E) compared to control (75% and 25%, respectively). Similarly we observed a slightly reduction, but not significantly difference, of the *GSK3 α* phosphorylation in insulin-stimulated hepatocytes after treatment with conditioned medium from macrophages (Fig. 2F). The expression of *G6Pase*, a key gluconeogenic protein, do not significantly increased in the hepatocytes after exposition to conditioned medium derived from macrophages palmitate-stimulated compared to control hepatocytes (Fig.2G). Together, these results showed that cytokines produced by macrophages could activate pathways that prevent insulin signaling in hepatocytes resulting in modest changes of gluconeogenesis and glycogenesis.

Macrophage knockdown of *NIK* ameliorates insulin resistance in hepatocytes

To determine if macrophage *NIK* is involved in palmitate-induced insulin resistance in hepatocytes we used siRNA transfection to perform knockdown of *NIK* in macrophages. We examined the effect of *NIK*-deficient macrophage-conditioned medium on insulin signaling of hepatocytes. RAW 264.7 cells were transfected with siRNA specific for *NIK* and siRNA control (scramble) for 36hs. Further macrophages

were activated by treatment with palmitate 500 μ M for 3h. Palmitate-containing medium was replaced with fresh medium, and macrophage-conditioned medium was collected 12h later. Knockdown of *NIK* significantly reduced TNF- α content (10%) in the culture medium of macrophages treated with palmitate (Fig 3A). *TRAF3* protein levels were slightly higher in siNIK- transfected macrophages treated with palmitate than control cells (siRNA scramble) (Fig 3B). These data suggest that macrophage *NIK* is involved in the regulation of inflammation mediated by lipid overload. Additionally, insulin signaling was evaluated in hepatocytes treated for 3h with conditioned medium from *NIK* knockdown macrophages palmitate-stimulated. In hepatocytes treated with conditioned medium collected from control macrophages, the insulin challenge did not promote additional *AKT* and *GSK3 α* phosphorylation compared to non-stimulated cells (Fig 3 C and D). However, in hepatocytes treated with conditioned medium from *NIK* knockdown macrophages the insulin challenge seems to promote an increase in *AKT* and *GSK3 α* phosphorylation compared to non-stimulated cells (Fig 3 C and D). Additionally, we performed an experiment using a combination of palmitate, TNF- α and H₂O₂ to promote the complete *NIK* activation in macrophages. After this protocol we used this treatment as a positive control. As can be observed in Fig. 3E hepatocytes exposed to conditioned medium from *NIK* knockdown macrophages presented higher *AKT* phosphorylation compared to hepatocytes exposed to conditioned medium from *control* macrophages (siRNA scramble) (Fig 3E). These data suggest that upon macrophage activation *NIK* seems mediates hepatic insulin resistance in a paracrine manner.

Discussion

Metabolic inflammation has been extensively examined in adipose tissue, but liver inflammation and its contribution to glucose metabolism are not fully understood. In the current study, we identified the *NIK* macrophage as a new metabolic regulator. *NIK* seems to be a linker between inflammation and obesity or dietary-induced insulin resistance in liver.

NIK expression is very low in normal livers(LIAO et al., 2004; SHENG et al., 2012). Genetic and/or environmental risk factors (e.g. alcohol, drugs and other toxins, hepatic steatosis, oxidative stress, and inflammation) may increase *NIK* levels and

activity leading to increase in the p52 NF- κ B2 levels in both mice and humans with liver injury (SHEN et al., 2014).

TRAF3 has been well documented to negatively regulate MAPK pathway and pro-inflammatory NF κ B through NIK degradation and the suppression of pro-inflammatory cytokines expression in myeloid cells (CHEN et al., 2015b; HÄCKER et al., 2006; OGANESYAN et al., 2006; TSENG et al., 2010). Chen and coworkers (CHEN et al., 2015a) (CHEN et al., 2015b) observed in mice that deletion of *TRAF3* in myeloid cells increased the expression of pro-inflammatory cytokines in both the liver and epididymal fat depots, confirming myeloid TRAF3 as a negative regulator of inflammation in mice. Here we used TRAF3 expression as an indicator of NIK expression, since endogenous NIK expression is not detectable.

We have demonstrated that in cell culture treated with palmitate, a commonly used *in vitro* model of lipid overload, macrophages exhibited increased secretion pattern of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β . Moreover, decrease in TRAF3 expression was observed in these cells, which is indicative of increased NIK expression. Knockdown of myeloid *NIK* decreased pro-inflammatory cytokine secretion, suggesting that NIK in myeloid cells promotes inflammation stimulated by fatty acids. TRAF3 gene expression was increased in hepatocytes treated with NIK-deficient macrophage-derived conditioned medium compared to hepatocytes treated with wild-type macrophage-derived conditioned medium, suggesting suppression of pro-inflammatory cytokines expression by non-canonical pathway in myeloid cells.

Obesity is associated with activation of cytokine receptors, TLRs, NLRs, and RLRs (CHAWLA; NGUYEN; GOH, 2011; GLASS; OLEFSKY, 2012; HÄCKER; TSENG; KARIN, 2011; HOTAMISLIGIL, 2006b; LUMENG; SALTIEL, 2011). Cytokines, toxic metabolites, DAMPs, and PAMPs are likely to activate macrophages via these receptors, leading to chronic inflammation in obesity. In myeloid cells, NIK and TRAF3 are common signaling molecules for these ligands and their cognate receptors (SHOELSON; GOLDFINE, 2009; TSENG et al., 2010).

In our model, myeloid cell-specific blockade of *NIK* attenuated fatty acid-induced insulin resistance in hepatocytes. Hepatocytes treated with NIK-deficient macrophage-derived conditioned medium presented higher GSK3 phosphorylation compared to hepatocytes treated with wild-type macrophage-derived conditioned

medium, as a consequence of phosphorylation of *Akt* (pSer473) robustly stimulated by insulin in the absence of NIK and consequently, lower cytokines secretion, which promotes GSK3 phosphorylation. These suggest that myeloid NIK may regulate hepatocyte metabolism in the liver in a paracrine fashion. In hepatocytes treated with conditioned medium from activated macrophages, the NIK pathway may increase expression of progluconeogenesis genes; alternatively, it may suppress the expression of antiglycogenesis genes.

In agreement with these findings, insulin signaling in the liver, skeletal muscle, and adipose tissue was improved in NIK-deficient obese mice (SHENG et al., 2012). Interestingly, Liangyou Rui Lab previously reported that inhibition of NIK in the liver attenuates hepatic glucose production and protects against obesity-associated hyperglycemia and glucose intolerance (SHENG et al., 2012). Mechanistically, NIK enhances the ability of glucagon to stimulate gluconeogenesis in hepatocytes, thus coupling inflammation to glucose counter regulation in obesity (SHENG et al., 2012). Besides, Shen and coworkers (SHEN et al., 2014) showed that NIK-induced liver inflammation may develop through several stages. Initially, NIK stimulated hepatocyte-derived mediators trigger immune cell recruitments and activation. In the second stage, immune cell-derived mediators further recruit and activate additional immune cells, thus forming a recruitment→chemokine/cytokine release→additional recruitment vicious cycle. Additionally, hepatocyte- and immune cell-derived mediators may activate hepatic stellate cells (HSCs), which in turn promote inflammation by secreting additional pro-inflammatory mediators. Curiously the authors found that NIK overexpression in hepatocytes alone was insufficient to cause apoptosis, and NIK-expressing hepatocytes died only in the presence of BMDMs. Moreover, depletion of Kupffer cells/macrophages largely eliminated NIK-induced liver oxidative stress and hepatocyte death, and reversed liver failure and death, another indicative of Myeloid cells NIK importance in liver homeostasis.

Taking together our data suggest that myeloid NIK may induce an increase in pro-inflammatory cytokines that modulate hepatic insulin signaling in the obesity and promote the development of diabetes. Therefore, myeloid NIK may have a critical role in the metabolic inflammation and contributes to glucose intolerance, liver inflammation, and hepatic steatosis associated to obesity.

References

- ABALLAY, L. R. et al. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. **Nutrition reviews**, v. 71, n. 3, p. 168–79, mar. 2013.
- AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 12, p. 9047–54, 24 mar. 2000.
- AGUIRRE, V. et al. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 2, p. 1531–7, 11 jan. 2002.
- BARNESS, L. A.; OPITZ, J. M.; GILBERT-BARNESS, E. Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143A, n. 24, p. 3016–3034, 15 dez. 2007.
- BELAHSEN, R. Nutrition transition and food sustainability. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 03, p. 385–388, 13 ago. 2014.
- BISHOP, G. A.; XIE, P. Multiple roles of TRAF3 signaling in lymphocyte function. **Immunologic research**, v. 39, n. 1-3, p. 22–32, 2007.
- BODEN, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 18, n. 2, p. 139–43, abr. 2011.
- BRAGGIO, E. et al. Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenstrom's macroglobulinemia. **Cancer research**, v. 69, n. 8, p. 3579–88, 15 abr. 2009.
- CAI, D. et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. **Nature medicine**, v. 11, n. 2, p. 183–90, fev. 2005.
- CANNON, B. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.
- CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, Y. P. S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 738–49, nov. 2011.

CHEN, Z. et al. Myeloid cell TRAF3 promotes metabolic inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 308, n. 6, p. E460–9, 15 mar. 2015a.

CHEN, Z. et al. Hepatocyte TRAF3 promotes insulin resistance and type 2 diabetes in mice with obesity. **Molecular metabolism**, v. 4, n. 12, p. 951–60, dez. 2015b.

CILDIR, G.; LOW, K. C.; TERGAONKAR, V. Noncanonical NF- κ B Signaling in Health and Disease. **Trends in molecular medicine**, 7 abr. 2016.

COLDITZ, G. A. et al. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. **Annals of internal medicine**, v. 122, n. 7, p. 481–6, 1 abr. 1995.

CONG, L. N. et al. Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 11, n. 13, p. 1881–90, dez. 1997.

FAGARASAN, S. et al. A lymphoplasia (aly)-type nuclear factor κ B-inducing kinase (NIK) causes defects in secondary lymphoid tissue chemokine receptor signaling and homing of peritoneal cells to the gut-associated lymphatic tissue system. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 9, p. 1477–86, 1 maio 2000.

FAN, S. et al. Role of Src signal transduction pathways in scatter factor-mediated cellular protection. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 12, p. 7561–77, 20 mar. 2009.

FÈVE, B.; BASTARD, J.-P. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 5, n. 6, p. 305–11, jun. 2009.

GALGANI, J.; RAVUSSIN, E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. **International journal of obesity (2005)**, v. 32 Suppl 7, p. S109–S119, 2008.

GLASS, C. K.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 15, n. 5, p. 635–45, 2 maio 2012.

GRAMMATICOS, P. C.; DIAMANTIS, A. Useful known and unknown views of the father of modern medicine, Hippocrates and his teacher Democritus. **Hellenic journal of nuclear medicine**, v. 11, n. 1, p. 2–4, 2008.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 415–45, 2011.

HABIB, A. A. et al. The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase to activate NF-kappa B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 12, p. 8865–74, 23 mar. 2001.

HÄCKER, H. et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. **Nature**, v. 439, n. 7073, p. 204–7, 12 jan. 2006.

HÄCKER, H.; TSENG, P.-H.; KARIN, M. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 7, p. 457–468, 2011.

HAN, M. S. et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6116, p. 218–22, 11 jan. 2013.

HASLAM, D. Obesity: a medical history. **Obesity Reviews**, v. 8, n. s1, p. 31–36, mar. 2007.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. T. Obesity. **The Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1197–1209, out. 2005.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF-κB Signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344–362, fev. 2008.

HOTAMISLIGIL, G. S. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 107, n. 2, p. 119–25, 1999.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders 1. **Nature**, v. 444, n. 1476-4687 (Electronic), p. 860–867, 2006a.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–7, 14 dez. 2006b.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.

Science (New York, N.Y.), v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1 jan. 1993.

IBRAHIM, S. H. et al. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 5, p. 1325–1336, 2016.

ISHII, M. et al. Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin signaling molecules. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 566, p. 26–35, 15 jan. 2015.

JIANG, X. et al. NF- κ B p65 transactivation domain is involved in the NF- κ B-inducing kinase pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 2, p. 583–590, fev. 2003.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–6, 14 dez. 2006.

KAIDANOVICH, O.; ELDAR-FINKELMAN, H. The role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 6, n. 5, p. 555–61, out. 2002.

LALANI, A. I. et al. Myeloid cell TRAF3 regulates immune responses and inhibits inflammation and tumor development in mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 194, n. 1, p. 334–48, 1 jan. 2015.

LIANG, C.; ZHANG, M.; SUN, S.-C. beta-TrCP binding and processing of NF- κ B2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. **Cellular signalling**, v. 18, n. 8, p. 1309–17, ago. 2006.

LIAO, G. et al. Regulation of the NF- κ B-inducing Kinase by Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 3-induced Degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 25, p. 26243–26250, 18 jun. 2004.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–84, jan. 2007.

LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111–7, jun. 2011.

MALININ, N. L. et al. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. **Nature**, v. 385, n. 6616, p. 540–4, 6 fev. 1997.

MARTINS, A. R. et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 30, 2012.

MATSUMOTO, M. et al. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 9, p. 2464–72, set. 2006.

MYERS, M. G.; WHITE, M. F. Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 36, n. 1, p. 615–58, 1996.

NAPOLITANO, G.; KARIN, M. Sphingolipids: the oil on the TRAFire that promotes inflammation. **Science signaling**, v. 3, n. 141, p. pe34, 2010.

NASSIR, F. et al. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. **Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 3, p. 167–75, mar. 2015.

NGUYEN, M. T. A. et al. JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35361–71, 21 out. 2005.

OGANESYAN, G. et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. **Nature**, v. 439, n. 7073, p. 208–11, 12 jan. 2006.

OTTO, C. et al. Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. **British journal of haematology**, v. 157, n. 6, p. 702–8, jun. 2012.

PARDO, V. et al. Opposite cross-talk by oleate and palmitate on insulin signaling in hepatocytes through macrophage activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 18, p. 11663–11677, 2015.

PARK, G. Y. et al. NIK is involved in nucleosomal regulation by enhancing histone H3 phosphorylation by IKKalpha. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18684–90, 7 jul. 2006.

POPKIN, B. M. Nutrition in transition: The changing global nutrition challenge. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 10, n. SUPPL., 2001.

- POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG, S. W. NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 1, p. 3–21, 2012.
- QING, G.; QU, Z.; XIAO, G. Stabilization of basally translated NF-kappaB-inducing kinase (NIK) protein functions as a molecular switch of processing of NF-kappaB2 p100. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40578–82, 9 dez. 2005.
- RANADIVE, S. A.; VAISSE, C. Lessons from Extreme Human Obesity: Monogenic Disorders. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 37, n. 3, p. 733–751, 2008.
- RAZANI, B.; REICHARDT, A. D.; CHENG, G. Non-canonical NF-κB signaling activation and regulation: principles and perspectives. **Immunological reviews**, v. 244, n. 1, p. 44–54, nov. 2011.
- ROSSI, D. et al. Alteration of BIRC3 and multiple other NF-κB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. **Blood**, v. 118, n. 18, p. 4930–4, 3 nov. 2011.
- ROTHER, M. et al. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. **Science (New York, N.Y.)**, v. 269, n. 5229, p. 1424–7, 8 set. 1995.
- SAITOH, Y. et al. Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 5118–29, 15 maio 2008.
- SAMUEL, V. T. et al. Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 29, p. 12121–6, 2009.
- SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 9, p. 2992–3002, set. 2008.
- SENFTLEBEN, U. et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5534, p. 1495–9, 24 ago. 2001.
- SHEN, H. et al. Mouse hepatocyte overexpression of NF-κB-inducing kinase (NIK)

triggers fatal macrophage-dependent liver injury and fibrosis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 60, n. 6, p. 2065–76, 2014.

SHENG, L. et al. NF- κ B-inducing kinase (NIK) promotes hyperglycemia and glucose intolerance in obesity by augmenting glucagon action. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 943–949, 2012.

SHOELSON, S. E.; GOLDFINE, A. B. Getting away from glucose: fanning the flames of obesity-induced inflammation. **Nature medicine**, v. 15, n. 4, p. 373–4, abr. 2009.

SONG, M. J. et al. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 346, n. 3, p. 739–45, 4 ago. 2006.

SOUMAYA, K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 771, p. 240–51, 2012.

SUMMERS, S. A. et al. The role of glycogen synthase kinase 3 β in insulin-stimulated glucose metabolism. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 25, p. 17934–40, 18 jun. 1999.

SUN, S. The noncanonical NF- κ B pathway. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 125–140, mar. 2012.

SUN, S.-C. Controlling the fate of NIK: a central stage in noncanonical NF- κ B signaling. **Science signaling**, v. 3, n. 123, p. pe18, 2010.

SUN, S.-C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 71–85, jan. 2011.

SUN, S.-C.; LEY, S. C. New insights into NF- κ B regulation and function. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 10, p. 469–478, out. 2008.

SUN, X. et al. [Effects of conditioned media for rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells on palmitic acid-induced insulin resistance in HepG2 cells]. **Zhonghua nei ke za zhi**, v. 54, n. 5, p. 439–44, maio 2015.

SUN, X. J. et al. Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 31, p. 22662–22672, 1992.

TATEYA, S.; KIM, F.; TAMORI, Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. AUG, p. 1–14, 2013.

THU, Y. M.; RICHMOND, A. NF- κ B inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 4, p. 213–26, ago. 2010.

TRIPATHY, S.; TORRES-GONZALEZ, M.; JUMP, D. B. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity corrects dietary fat-induced hyperglycemia in obese C57BL/6J mice. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 9, p. 2642–54, set. 2010.

TSENG, P.-H. et al. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. **Nature immunology**, v. 11, n. 1, p. 70–5, jan. 2010.

VALLABHAPURAPU, S. et al. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. **Nature immunology**, v. 9, n. 12, p. 1364–70, dez. 2008.

VALVERDE, A. M. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes. **Diabetes**, v. 52, n. 9, p. 2239–48, set. 2003.

VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; SAAD, M. J. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota and metabolic inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 3, p. 245–271, 2015.

VINCE, J. E. et al. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. **Cell**, v. 131, n. 4, p. 682–93, 16 nov. 2007.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WEISBERG, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 115–124, 4 jan. 2006.

XIAO, G.; HARHAJ, E. W.; SUN, S. C. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. **Molecular cell**, v. 7, n. 2, p. 401–9, fev. 2001.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821–30, dez. 2003.

XU, Y.; CHENG, G.; BALTIMORE, D. Targeted Disruption of TRAF3 Leads to Postnatal Lethality and Defective T-Dependent Immune Responses. **Immunity**, v. 5, n. 5, p. 407–415, nov. 1996.

ZARNEGAR, B. et al. Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 9, p. 3503–3508, 2008a.

ZARNEGAR, B. J. et al. Noncanonical NF-κB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. **Nature Immunology**, v. 9, n. 12, p. 1371–1378, 9 dez. 2008b.

ZHANG, X. et al. Role of TLR4-Mediated PI3K/AKT/GSK-3 β Signaling Pathway in Apoptosis of Rat Hepatocytes. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

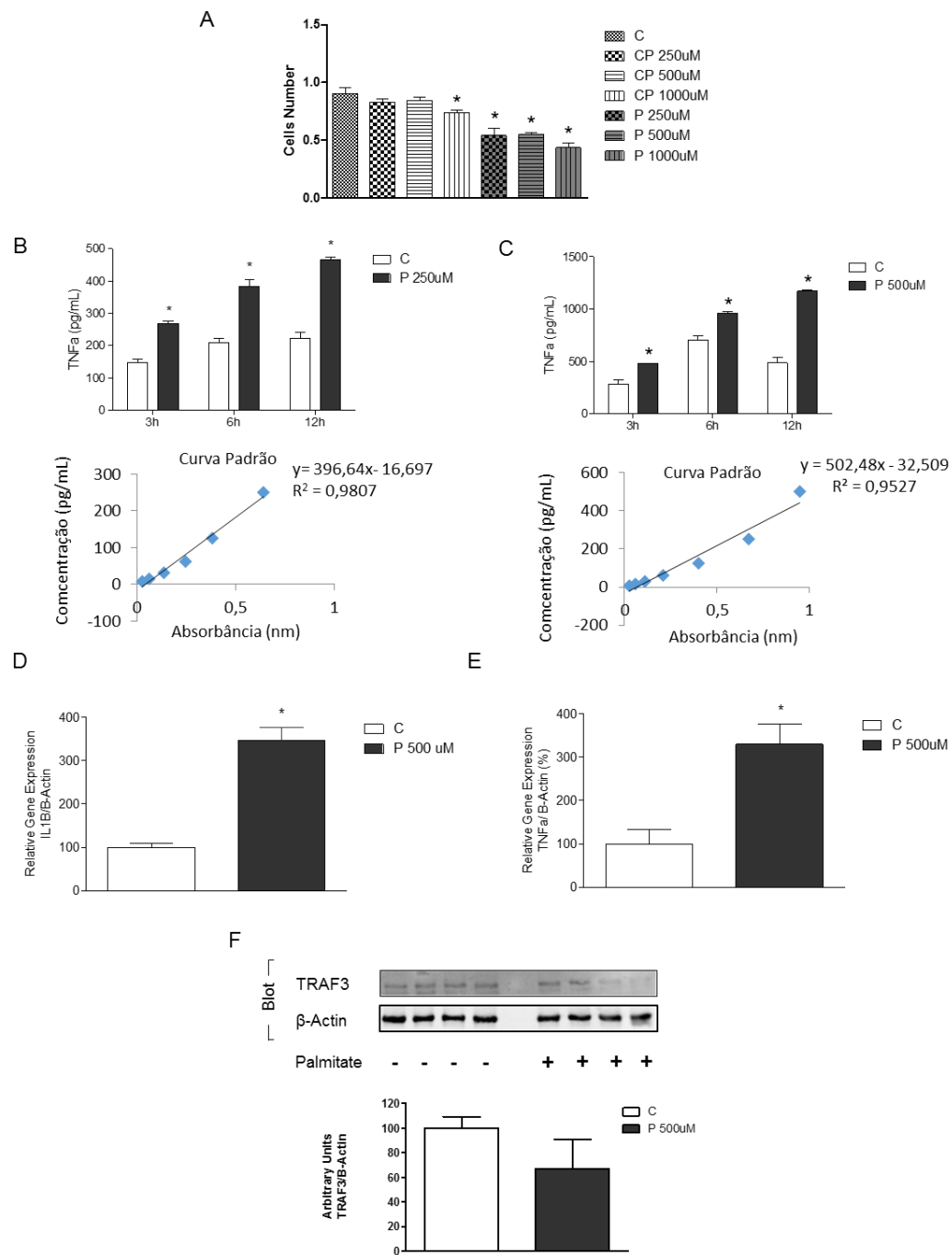


Figure 1. Palmitate treatment induces inflammation in cell line macrophages RAW264.7 by activation of non-canonical NFkB pathway

RAW 264.7 macrophages were challenged with palmitate during 3 hours. Palmitate-containing medium was replaced with fresh medium and macrophage-conditioned medium and cells were evaluated 12h later. **A.** Macrophages viability test after exposition to different concentrations of palmitate (P 250uM, P 500uM ou P 1000uM) and their respective controls (BSA+NaOH). **B** and **C.** TNF-α levels in macrophage-conditioned medium treated with BSA+NaOH (C) or palmitate (P 250uM ou P 500uM) determined by ELISA. Relative gene expression of TNF-α (**D**) and IL-1β (**E**) in RAW

264.7 treated with BSA+NaOH (C) or palmitate 500 μ M (P) by quantitative Real Time PCR. (F) TRAF3 content in RAW 264.7 treated with BSA+NaOH (C) or palmitate 500 μ M (P) evaluated by Western Blotting. Results are expressed in Mean \pm SEM. n= 2-4 per group. p<0,05 *C vs CP 1000 μ M, P 250 μ M, P 500 μ M, P 1000 μ M.

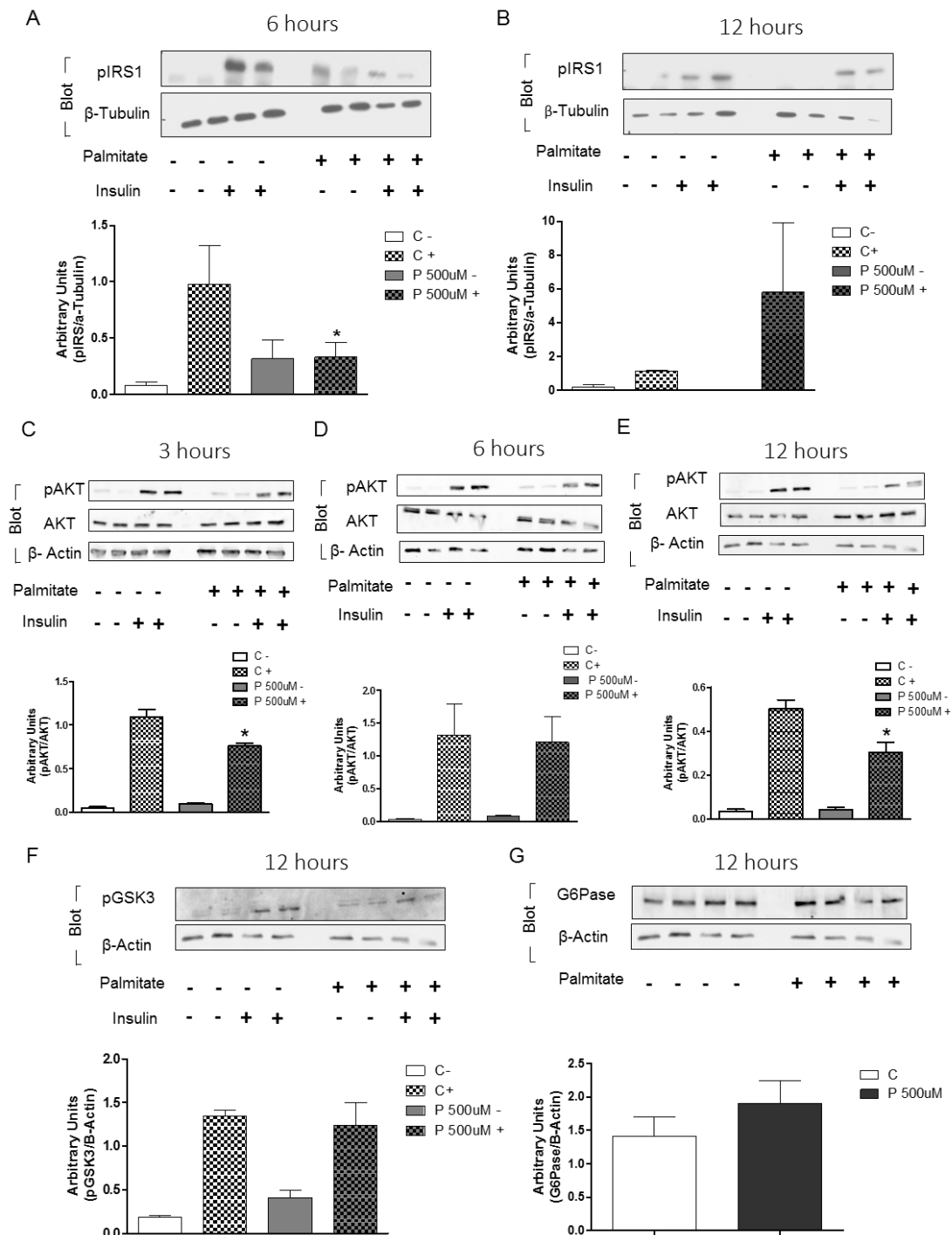


Figure 2. Pro-inflammatory cytokine secreted by macrophages challenged with palmitate act as mediators of insulin resistance in hepatocytes

RAW 264.7 macrophages were challenged with palmitate during 3 hours. Palmitate-containing medium was replaced with fresh medium and macrophage-conditioned medium was collected 12h

later. Hepatocytes (Hepa1c1c7) were treated with the macrophage-conditioned medium and IRS1 phosphorylation was determined after 6 hours (A) and 12 hours (B) by Western Blotting. Protein content of total and phosphorylated AKT was determined after 3 (C), 6 (D) and 12 hours (E). pGSK3 and G6Pase were evaluated after 12 hours (F and G) of treatment with macrophage-conditioned medium by Western Blotting. Hepa1c1c7 was stimulated with 100nm insulin for 10 minutes. Results are expressed in Mean \pm SEM. n= 2 per group. *p<0,05 P500 μ M+ vs C+.

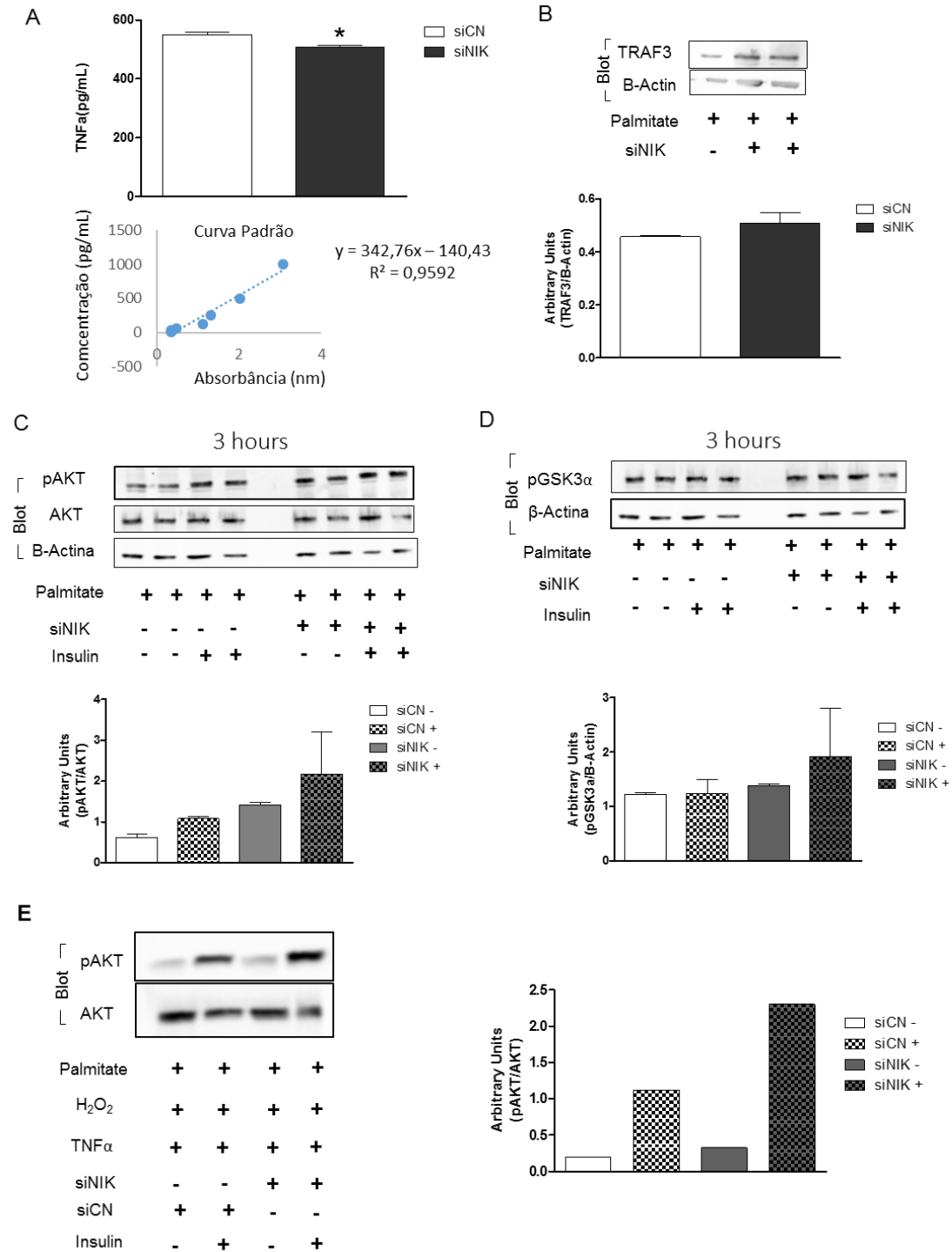


Figure 3. NIK inhibition via siRNA in macrophages attenuate insulin resistance development in hepatocytes

RAW 264.7 was transfected with siRNA for NIK (siNIK) or scramble siRNA (siCN) for 36hs. Macrophages were challenged with palmitate during 3 hours. Palmitate-containing medium was replaced with fresh medium and macrophage-conditioned medium was collected 12h later. **A.** TNF- α levels in macrophage-conditioned medium transfected with siNIK was determined by ELISA. **B.** TRAF3 content from macrophages transfected with siNIK was measured by Western Blotting. Hepatocytes (Hepa1c1c7) were treated with the macrophage-conditioned medium for 3 hours and protein content of total and phosphorylated AKT (**C**) and phosphorylated GSK3 (**D**) were assessed by Western Blotting. In addition to the previously described treatment, RAW 264.7 was also treated with a combination of palmitate (100uM), H₂O₂ (100nM) and TNF- α (10 ng/mL) and the macrophage-conditioned medium was used to Hepa1c1c7 treatment. Protein content of total and phosphorylated AKT was assessed by Western Blotting (**E**). Hepa1c1c7 was stimulated with 10nm insulin for 100 minutes. Results are expressed in Mean \pm SEM. n= 1-6 per group. p<0,05 *siNIK vs siCN

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e ácidos graxos saturados (ácido palmítico) são ligantes capazes de estimular a via de indução do fator nuclear κ B (NF- κ B), um importante fator de transcrição indutor da expressão de citocinas pró-inflamatória, sendo assim, capazes de retroalimentar o ciclo inflamatório celular (Oeckinghaus, Hayden et al. 2011). Em resposta a estímulos inflamatórios, como os utilizados em nosso modelo experimental, a via canônica de NF- κ B induz a conversão de sinais para o complexo IKK (I κ B kinase), composto de duas subunidades catalíticas (IKK α and IKK β) e uma regulatória (IKK γ). Sob ativação, IKK fosforila I κ B α em dois resíduos de serina N-terminais, disparando sua ubiquitinação e degradação pelo proteassoma. Isso leva à liberação e translocação do complexo NF- κ B, predominantemente dos dímeros p50/RelA e p50/c-Rel, para o núcleo (JIANG et al., 2003; SENFTLEBEN et al., 2001).

A via alternativa de ativação de NF- κ B difere da clássica por ativar diferentes proteínas, sendo uma delas a TRAF3. Em condições basais, TRAF3 é encontrada associada à NIK, interagindo com TRAF2 associada a cIAP. A interação NIK-cIAP resulta em ubiquitinação persistente de NIK, e constitutiva degradação proteossomal em células não estimuladas. A estimulação de um receptor, induz aumento da atividade de ubiquitina-ligase de TRAF2, que conduz à ubiquitinação de cIAP, aumentando a atividade de ubiquitina ligase de cIAP para TRAF3. Isto resulta na poliubiquitinação e degradação de TRAF3 (e, em menor grau, TRAF2). Uma vez que a concentração de TRAF3 atinge um determinado limiar, NIK recém-sintetizada deixa de se associar com o complexo TRAF2-cIAP e não é mais dirigida para a degradação. O acúmulo de NIK resulta na ativação da via alternativa de NF- κ B pelo dímero p52-RELB (LIAO et al., 2004; ZARNEGAR et al., 2008b).

Como observado no presente estudo, o tratamento com palmitato foi capaz de induzir um padrão crescente de secreção de TNF- α e IL-1 β após o estímulo, em diferentes concentrações, bem como a ativação da via não-canônica de NF- κ B, confirmada pela análise de TRAF-3.

A detecção dos níveis protéicos de NIK endógena é muito dificultada pela baixa concentração decorrente do constante estímulo de degradação proteossomal, o que torna impossível sua detecção, mesmo após sua estabilização, mediada por

ativação dos receptores da família TNFR (LIAO et al., 2004; QING; QU; XIAO, 2005). Por essa razão, a avaliação de TRAF3 torna-se uma análise indireta da ativação de NIK, mas confiável do ponto de vista funcional.

Como TRAF3 mostrou-se reduzida nos macrófagos em nosso modelo é possível sugerir que o tratamento com palmitato induziu recrutamento dessa proteína, com consequente ubiquitinação e degradação pelo proteassoma, levando à fosforilação e estabilização de NIK e consequente ativação da via alternativa de NF- κ B. Em um órgão metabolicamente ativo, como o fígado, a manutenção do estado inflamatório em macrófagos ativados culmina em um quadro inflamatório hepático generalizado, resultando em intolerância à glicose e resistência à insulina no órgão.

Os ácidos graxos são amplamente consumidos na dieta atual, contribuindo para o aumento da obesidade em toda a população nos últimos anos. Além de executar um importante papel no desenvolvimento do ganho de peso por promover acúmulo de tecido adiposo, os lipídeos são capazes de interagir nas vias moleculares e causar repercussões importantes, como alterações no metabolismo da glicose (ISHII et al., 2015; SUN et al., 2015).

O ácido palmítico, um ácido graxo saturado de cadeia longa, amplamente consumido na dieta ocidental, desempenha um papel prejudicial na sinalização da insulina. Da mesma forma que com os outros ácidos graxos saturados, este prejuízo pode ocorrer em diversos pontos da via, dentre eles, a redução da fosforilação de IRS-1 e AKT (MARTINS et al., 2012).

Claramente, a obesidade é a maior causa de resistência à insulina, e a epidemia da obesidade parece contribuir para o aumento da incidência de DM2. A etiologia da resistência à insulina vem sendo intensivamente estudada, e atualmente reconhece o papel da inflamação como uma importante causa da resistência ao sinal da insulina causada por obesidade (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). A evidência desta relação iniciou-se quando observou-se que TNF- α , uma citocina associada a caquexia no câncer, estava elevada no tecido adiposo de animais obesos e que a inibição desta citocina melhorava a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Estudos subsequentes demonstraram um mecanismo fundamental para compreender como a obesidade induz o estado inflamatório. Este mecanismo envolve o aumento da

infiltração de macrófagos em tecidos metabolicamente ativos (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003), induzindo diferenciação destes para um estado mais pró-inflamatório, de células M1 (macrófagos classicamente ativados), do que anti-inflamatório, de células do tipo M2 (macrófagos alternativamente ativados) (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; LUMENG; SALTIEL, 2011; NGUYEN et al., 2005)

Na obesidade, há uma maior polarização de macrófagos do tipo M1 (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007) e estas células secretam diferentes citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL1- β , etc, que por sua vez atuam através de mecanismos parácrinos que inibem diretamente a ação da insulina em células responsivas ao sinal da insulina, como os hepatócitos (FÈVE; BASTARD, 2009; HOTAMISLIGIL, 1999). A sinalização da insulina consiste na ativação de quinases induzidas por estress, tais como IKK β , S6K, JNK 1 e PKC θ que fosforilam, por exemplo, IRS1 em serina, ação que impede a propagação do sinal da insulina (HOTAMISLIGIL, 2006a; SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008; VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015).

O presente estudo utilizou ensaios com linhagem de hepatócitos tratados com meio condicionado, proveniente de macrófagos estimulados, a fim de determinar o prejuízo na sinalização da insulina, mediado por citocinas pró-inflamatórias. Foi possível observar diminuição na fosforilação de IRS1 e AKT, dois importantes elementos da via de sinalização da insulina, modulados pelo estímulo inflamatório. A utilização de meio condicionado é uma prática utilizada para determinar, por exemplo, se existe um cross-talk entre diferentes tipos celulares (PARDO et al., 2015). Este método também foi utilizado em nosso estudo para avaliar se as citocinas produzidas pelos macrófagos, após estímulo com palmitato, por si só poderiam ocasionar prejuízos na via da sinalização da insulina em hepatócitos, pois, células hepáticas possuem receptores, como do tipo TLR4, (IBRAHIM et al., 2016; ZHANG et al., 2015) que, após estímulo com palmitato, poderiam também elevar a produção de citocinas pró-inflamatórias. Portanto o meio condicionado foi utilizado para excluir esse fator.

É bem estabelecido na literatura que a cascata de sinalização do hormônio insulina é bastante complexa e envolve várias proteínas-chaves. O substrato do receptor de insulina (IRS-1) é uma das primeiras proteínas a ser recrutada e fosforilada quando este hormônio liga-se ao seu receptor (IR) na

membrana celular, que se liga a outra proteína (PI3K) para a propagação do sinal (Sun et al. 1992). Uma vez ativada, a PI3K recruta e fosforila AKT que, por sua vez, auxilia na translocação do GLUT4 para a membrana citoplasmática de tecidos insulino-dependentes para a captação de glicose, como músculo e tecido adiposo (Cong et al. 1997). No entanto, em outros tecidos, o papel dessa via não é limitado apenas à translocação de transportadores de glicose, sendo fundamental na síntese de glicogênio, bloqueio da gliconeogênese e aumento da síntese protéica.

A proteína AKT é responsável, no fígado, por induzir a síntese de glicogênio e a supressão da produção de glicose hepática. O mecanismo pela qual AKT contribui para a síntese de glicogênio hepático se dá pela ativação da glicogênio-sintase (GS) e inibição da glicogenólise. GSK-3 é uma proteína serina quinase intermediária da síntese de glicogênio e sua inativação, via fosforilação, mediada por AKT, contribui para a redução da fosforilação de GS e ativação da síntese do glicogênio (SUMMERS et al., 1999). Apesar de nossos resultados não mostraram uma alteração significativa na fosforilação de GSK3 após o tratamento dos hepatócitos com meio condicionado, uma pequena diminuição na fosforilação, mediada pela insulina, foi observada. Classicamente seria esperada uma diminuição importante na fosforilação desta proteína, em consequência à diminuição da ativação de AKT, culminando em bloqueio da síntese de glicogênio, fenômeno presente em um quadro de resistência ao sinal da insulina (KAIDANOVICH; ELDAR-FINKELMAN, 2002). No entanto, a contribuição de AKT para a regulação da GS ainda é alvo de estudo, uma vez que várias moléculas de sinalização não influenciadas pela AKT também podem modular esse processo (VALVERDE et al., 2003). A avaliação de G6Pase mostrou uma expressão proteica que tendeu a ser elevada, podendo ser um indicativo de que o tratamento com palmitato diminuiu a fosforilação de AKT. Como resultado deste evento, não houve translocação do fator de transcrição FOXO1 para o citoplasma, consequentemente FOXO1 permaneceu no núcleo, transcrevendo enzimas da via da gliconeogênese, como G6Pase e PEPCK, fenômeno comumente observado em modelos animais de sobrecarga nutricional (TRIPATHY; TORRES-GONZALEZ; JUMP, 2010).

A resistência à insulina está relacionada com a ação de citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos infiltrados em tecidos metabolicamente ativos (Nikolajczk, Jagannathan-Bogdan et al. 2011). Um estudo que deletou IKK β em macrófagos, mostrou que houve supressão sistêmica de indução da inflamação

quando os animais ingeriram dieta hiperlipídica, consequentemente resultando em melhoria na tolerância à glicose e na sensibilidade à ação da insulina (Arkan, Hevener et al. 2005).

A sinalização da insulina pode ser regulada negativamente por outras proteínas, como a JNK e a PTP1B. A PTP1B é uma enzima fosfatase que atua sobre IR e IRS-1, induzindo desfosforilação dos resíduos de tirosina, impedindo a transdução do sinal da insulina (Panzhinskiy et al. 2013). Já a JNK, assim como a IKK, está ativa em um ambiente com características inflamatórias e também possui a capacidade de interferir na sinalização de insulina, pela fosforilação em serina, e consequente inibição, de IRS1 (Ye 2013).

No fígado, uma importante função da insulina é mediar o bloqueio da gliconeogênese. Indivíduos com resistência à ação da insulina não possuem o controle da síntese de glicose, fator este que contribui acentuadamente para a elevação da glicose sérica nestes indivíduos, uma vez que a insulina torna-se incapaz de sinalizar a diminuição da transcrição do gene da PEPCK e G6Pase, via inibição da FOXO-1 (Quinn et al. 2005). Deste modo, o aumento da expressão dessas duas proteínas (PEPCK e G6Pase) passou a ser utilizado como marcador da resistência à insulina.

Entretanto, Samuel e colaboradores (2009), utilizando um modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2, induzido por streptozotocina, mostraram que, apesar de frequentemente utilizadas como marcadores de resistência à insulina, a expressão de PEPCK e G6Pase podem não estar alterada mediante estímulo gliconeogênico. Nesse estudo, os animais com DM2 apresentaram elevada glicemia de jejum quando comparados ao seu controle, em contrapartida, os níveis das enzimas gliconeogênicas PEPCK e G6Pase analisadas por qPCR e Western blott não apresentaram-se alterados. Posteriormente, as análises foram comparadas a de humanos obesos, resistentes à insulina e diabéticos tipo 2 submetidos à cirurgia bariátrica e os resultados da biópsia do fígado destes pacientes sugeriram que a hiperglicemia observada nos pacientes com diabetes mellitus tipo 2 não pode ser atribuída ao aumento da expressão dessas enzimas ditas chaves na via da gliconeogênese (SAMUEL et al., 2009). Tais dados poderiam explicar os resultados obtidos em nosso estudo. Apesar da fosforilação de AKT mostrar-se diminuída em hepatócitos, a expressão de G6Pase não foi alterada, o que não necessariamente descarta a possibilidade da gliconeogênese estar ativa nessas células.

Para verificar se a ativação da via não-canônica de NF- κ B em macrófagos seria essencial para a ativação de vias inflamatórias, podendo levar ao desenvolvimento de resistência à insulina em hepatócitos, experimentos utilizando siRNA para NIK foram conduzidos.

Nossos resultados indicam que o tratamento com palmitato, em células submetidas ao bloqueio de NIK, levou a uma diminuição na concentração de TNF- α no meio de cultura. Adicionalmente, a expressão de TRAF3 em macrófagos tratados com palmitato, após transfecção com siRNA para NIK, mostrou-se visivelmente maior. O bloqueio de NIK também foi capaz de restaurar a fosforilação de AKT induzida por insulina. Entretanto, o tratamento com siRNA para NIK não induziu alteração na fosforilação de GSK3 α . Apesar de não haver significância, os resultados apontam para uma importante participação de NIK de macrófagos no desenvolvimento de resistência à insulina em hepatócitos.

TRAF3 pode ser ativada por diversos receptores e fica evidente o seu amplo papel funcional no sistema imune, além de exercer função crucial no desenvolvimento, pois animais nocautes para TRAF3 não sobrevivem após o nascimento (XU; CHENG; BALTIMORE, 1996). Dados obtidos a partir de diferentes modelos experimentais com deficiência de TRAF3 indicam fortemente que funções exacerbadas de TRAF3 contribuem para a patogênese de diversas doenças (BRAGGIO et al., 2009; OTTO et al., 2012; ROSSI et al., 2011)

Experimentos *in vitro* indicaram que TRAF3 regula a produção de citocinas pró-inflamatórias em células mielóides (HÄCKER et al., 2006; OGANESYAN et al., 2006). Em 2015, um grupo de pesquisadores mostraram que em animais nocaute específico para TRAF3 em células de origem mielóide houve ativação constitutiva de NF- κ B em macrófagos e neutrófilo, e que esta proteína se mostrou como um importante regulador da resposta imune pois se mostrou eficaz na inibição da inflamação (LALANI et al., 2015). Esses dados vão ao encontro dos nossos resultados, no qual um aumento de TRAF3 em células RAW 264.7 ocasionado pelo bloqueio de NIK, impediu a produção de TNF- α após estímulo com palmitato, consequentemente a não produção de citocinas pró-inflamatórias não induziu resistência ao sinal da insulina em hepatócitos.

Reforçando nossa hipótese, experimento utilizando uma mistura de palmitato (100 μ M), TNF- α (10ng/mL) e H₂O₂ (100nM) foram conduzidos em

macrófagos, na presença ou ausência de siRNA para NIK. Os resultados mostram que o tratamento com a mistura não impediu a fosforilação de AKT, induzida por insulina nos hepatócitos, apesar da evidente redução observada. No entanto, o bloqueio de NIK em RAW264.7 mostrou-se capaz de aumentar a fosforilação de AKT em 200% nas células Hepa1c1c7, após tratamento com meio condicionado.

Um importante estudo desenvolvido na Universidade de Michigan mostrou que NIK é superativada em diversas condições, como no fígado de camundongos geneticamente obesos, com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, ou pelo tratamento com TNF- α , H₂O₂ e ácido palmítico. O estudo ainda mostrou que a inibição de NIK melhora a hiperglicemia e a intolerância à glicose, uma vez que NIK estimularia a síntese hepática de glicose mediada pelo hormônio glucagon. De acordo com os autores, a superexpressão de NIK seria o maior contribuidor para a resposta anormal ao glucagon observada na obesidade, uma vez que esta proteína agiria como um regulador positivo da gliconeogênese, por aumentar a ação do glucagon e de outros fatores ativadores de CREB e de seus alvos: as enzimas gliconeogênicas PEPCK e G6Pase. Os autores também sugerem que a ativação de IKK por NIK poderia ocasionar resistência ao sinal da insulina em hepatócitos (SHENG et al., 2012).

Dois anos depois, o mesmo grupo de pesquisadores mostrou que altos níveis de NIK hepática é capaz de promover a progressão da doença hepática. O estudo foi realizado em animais mutantes que superexpressavam NIK, mostrando que seu acúmulo no tecido hepático estava associado à ativação de estresse oxidativo, provocando inflamação e, conseqüentemente, instaurando um quadro de fibrose que progredia até a morte celular. O trabalho sugere que este mecanismo de injúria hepática é dependente da ativação de células do sistema imune inato, como as células de Kupffer, pois após um tratamento de depleção destas células por GdCl₃, caspase-3 não foi ativada não promovendo apoptose nos hepatócitos. Este estudo mostrou a existência de uma forte comunicação entre células do sistema imune e NIK (SHEN et al., 2014).

Em conjunto, os resultados sugerem a presença de um mecanismo fisiológico novo, relacionado à ativação de uma via alternativa de indução de inflamação por macrófagos, induzido por palmitato, o qual é dependente da ativação de NIK, proteína central da via não-canônica de NF- κ B, que pode estar presente em obesos. Tal via poderia ser considerada como elemento importante no *crosstalk*

entre células de Kupfer e hepatócitos no fígado, contribuindo para o desenvolvimento de resistência à insulina mediada pela sobrecarga nutricional, ou mais precisamente, sobrecarga lipídica.

Se confirmados, os achados do presente estudo mostram-se de grande relevância clínica, uma vez que nossos resultados apontam para a presença de um mecanismo fisiológico que pode contribuir para os danos metabólicos observados em indivíduos obesos, podendo, inclusive, servir como direcionamento para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento dessa patologia, que tenham NIK como alvo.

REFERÊNCIAS

- ABALLAY, L. R. et al. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. **Nutrition reviews**, v. 71, n. 3, p. 168–79, mar. 2013.
- AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 12, p. 9047–54, 24 mar. 2000.
- AGUIRRE, V. et al. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 2, p. 1531–7, 11 jan. 2002.
- BARNES, L. A.; OPITZ, J. M.; GILBERT-BARNES, E. Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143A, n. 24, p. 3016–3034, 15 dez. 2007.
- BELAHSEN, R. Nutrition transition and food sustainability. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 03, p. 385–388, 13 ago. 2014.
- BISHOP, G. A.; XIE, P. Multiple roles of TRAF3 signaling in lymphocyte function. **Immunologic research**, v. 39, n. 1-3, p. 22–32, 2007.
- BODEN, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 18, n. 2, p. 139–43, abr. 2011.
- BRAGGIO, E. et al. Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenstrom's macroglobulinemia. **Cancer research**, v. 69, n. 8, p. 3579–88, 15 abr. 2009.
- CAI, D. et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. **Nature medicine**, v. 11, n. 2, p. 183–90, fev. 2005.
- CANNON, B. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.
- CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, Y. P. S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 738–49, nov.

2011.

CHEN, Z. et al. Myeloid cell TRAF3 promotes metabolic inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 308, n. 6, p. E460–9, 15 mar. 2015a.

CHEN, Z. et al. Hepatocyte TRAF3 promotes insulin resistance and type 2 diabetes in mice with obesity. **Molecular metabolism**, v. 4, n. 12, p. 951–60, dez. 2015b.

CILDIR, G.; LOW, K. C.; TERGAONKAR, V. Noncanonical NF- κ B Signaling in Health and Disease. **Trends in molecular medicine**, 7 abr. 2016.

COLDITZ, G. A. et al. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. **Annals of internal medicine**, v. 122, n. 7, p. 481–6, 1 abr. 1995.

CONG, L. N. et al. Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 11, n. 13, p. 1881–90, dez. 1997.

FAGARASAN, S. et al. Alymphoplasia (aly)-type nuclear factor kappaB-inducing kinase (NIK) causes defects in secondary lymphoid tissue chemokine receptor signaling and homing of peritoneal cells to the gut-associated lymphatic tissue system. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 9, p. 1477–86, 1 maio 2000.

FAN, S. et al. Role of Src signal transduction pathways in scatter factor-mediated cellular protection. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 12, p. 7561–77, 20 mar. 2009.

FÈVE, B.; BASTARD, J.-P. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 5, n. 6, p. 305–11, jun. 2009.

GALGANI, J.; RAVUSSIN, E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. **International journal of obesity (2005)**, v. 32 Suppl 7, p. S109–S119, 2008.

GLASS, C. K.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 15, n. 5, p. 635–45, 2 maio 2012.

GRAMMATICOS, P. C.; DIAMANTIS, A. Useful known and unknown views of the father of modern medicine, Hippocrates and his teacher Democritus. **Hellenic journal of nuclear medicine**, v. 11, n. 1, p. 2–4, 2008.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 415–45, 2011.

HABIB, A. A. et al. The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase to activate NF-kappa B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 12, p. 8865–74, 23 mar. 2001.

HÄCKER, H. et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. **Nature**, v. 439, n. 7073, p. 204–7, 12 jan. 2006.

HÄCKER, H.; TSENG, P.-H.; KARIN, M. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 7, p. 457–468, 2011.

HAN, M. S. et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin

- resistance and inflammation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6116, p. 218–22, 11 jan. 2013.
- HASLAM, D. Obesity: a medical history. **Obesity Reviews**, v. 8, n. s1, p. 31–36, mar. 2007.
- HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. T. Obesity. **The Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1197–1209, out. 2005.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344–362, fev. 2008.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 107, n. 2, p. 119–25, 1999.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders 1. **Nature**, v. 444, n. 1476-4687 (Electronic), p. 860–867, 2006a.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–7, 14 dez. 2006b.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1 jan. 1993.
- IBRAHIM, S. H. et al. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 5, p. 1325–1336, 2016.
- ISHII, M. et al. Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin signaling molecules. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 566, p. 26–35, 15 jan. 2015.
- JIANG, X. et al. NF- κ B p65 transactivation domain is involved in the NF- κ B-inducing kinase pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 2, p. 583–590, fev. 2003.
- KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–6, 14 dez. 2006.
- KAIDANOVICH, O.; ELDAR-FINKELMAN, H. The role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 6, n. 5, p. 555–61, out. 2002.
- LALANI, A. I. et al. Myeloid cell TRAF3 regulates immune responses and inhibits inflammation and tumor development in mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 194, n. 1, p. 334–48, 1 jan. 2015.
- LIANG, C.; ZHANG, M.; SUN, S.-C. beta-TrCP binding and processing of NF- κ B2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. **Cellular signalling**, v. 18, n. 8, p. 1309–17, ago. 2006.
- LIAO, G. et al. Regulation of the NF- κ B-inducing Kinase by Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 3-induced Degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 25, p. 26243–26250, 18 jun. 2004.

- LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–84, jan. 2007.
- LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111–7, jun. 2011.
- MALININ, N. L. et al. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. **Nature**, v. 385, n. 6616, p. 540–4, 6 fev. 1997.
- MARTINS, A. R. et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 30, 2012.
- MATSUMOTO, M. et al. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 9, p. 2464–72, set. 2006.
- MYERS, M. G.; WHITE, M. F. Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 36, n. 1, p. 615–58, 1996.
- NAPOLITANO, G.; KARIN, M. Sphingolipids: the oil on the TRAFire that promotes inflammation. **Science signaling**, v. 3, n. 141, p. pe34, 2010.
- NASSIR, F. et al. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. **Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 3, p. 167–75, mar. 2015.
- NGUYEN, M. T. A. et al. JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35361–71, 21 out. 2005.
- OGANESYAN, G. et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. **Nature**, v. 439, n. 7073, p. 208–11, 12 jan. 2006.
- OTTO, C. et al. Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. **British journal of haematology**, v. 157, n. 6, p. 702–8, jun. 2012.
- PARDO, V. et al. Opposite cross-talk by oleate and palmitate on insulin signaling in hepatocytes through macrophage activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 18, p. 11663–11677, 2015.
- PARK, G. Y. et al. NIK is involved in nucleosomal regulation by enhancing histone H3 phosphorylation by IKKalpha. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18684–90, 7 jul. 2006.
- POPKIN, B. M. Nutrition in transition: The changing global nutrition challenge. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 10, n. SUPPL., 2001.
- POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG, S. W. NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 1, p. 3–21, 2012.
- QING, G.; QU, Z.; XIAO, G. Stabilization of basally translated NF-kappaB-inducing kinase (NIK) protein functions as a molecular switch of processing of NF-kappaB2 p100. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40578–82, 9 dez. 2005.
- RANADIVE, S. A.; VAISSE, C. Lessons from Extreme Human Obesity: Monogenic

Disorders. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 37, n. 3, p. 733–751, 2008.

RAZANI, B.; REICHARDT, A. D.; CHENG, G. Non-canonical NF- κ B signaling activation and regulation: principles and perspectives. **Immunological reviews**, v. 244, n. 1, p. 44–54, nov. 2011.

ROSSI, D. et al. Alteration of BIRC3 and multiple other NF- κ B pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. **Blood**, v. 118, n. 18, p. 4930–4, 3 nov. 2011.

ROTHER, M. et al. TRAF2-mediated activation of NF- κ B by TNF receptor 2 and CD40. **Science (New York, N.Y.)**, v. 269, n. 5229, p. 1424–7, 8 set. 1995.

SAITOH, Y. et al. Overexpressed NF- κ B-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 5118–29, 15 maio 2008.

SAMUEL, V. T. et al. Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 29, p. 12121–6, 2009.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 9, p. 2992–3002, set. 2008.

SENFTLEBEN, U. et al. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5534, p. 1495–9, 24 ago. 2001.

SHEN, H. et al. Mouse hepatocyte overexpression of NF- κ B-inducing kinase (NIK) triggers fatal macrophage-dependent liver injury and fibrosis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 60, n. 6, p. 2065–76, 2014.

SHENG, L. et al. NF- κ B-inducing kinase (NIK) promotes hyperglycemia and glucose intolerance in obesity by augmenting glucagon action. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 943–949, 2012.

SHOELSON, S. E.; GOLDFINE, A. B. Getting away from glucose: fanning the flames of obesity-induced inflammation. **Nature medicine**, v. 15, n. 4, p. 373–4, abr. 2009.

SONG, M. J. et al. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 346, n. 3, p. 739–45, 4 ago. 2006.

SOUMAYA, K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 771, p. 240–51, 2012.

SUMMERS, S. A. et al. The role of glycogen synthase kinase 3 β in insulin-stimulated glucose metabolism. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 25, p. 17934–40, 18 jun. 1999.

SUN, S. The noncanonical NF- κ B pathway. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 125–140, mar. 2012.

SUN, S.-C. Controlling the fate of NIK: a central stage in noncanonical NF- κ B signaling. **Science signaling**, v. 3, n. 123, p. pe18, 2010.

SUN, S.-C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. **Cell research**, v. 21, n. 1, p.

71–85, jan. 2011.

SUN, S.-C.; LEY, S. C. New insights into NF- κ B regulation and function. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 10, p. 469–478, out. 2008.

SUN, X. et al. [Effects of conditioned media for rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells on palmitic acid-induced insulin resistance in HepG2 cells]. **Zhonghua nei ke za zhi**, v. 54, n. 5, p. 439–44, maio 2015.

SUN, X. J. et al. Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 31, p. 22662–22672, 1992.

TATEYA, S.; KIM, F.; TAMORI, Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. AUG, p. 1–14, 2013.

THU, Y. M.; RICHMOND, A. NF- κ B inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 4, p. 213–26, ago. 2010.

TRIPATHY, S.; TORRES-GONZALEZ, M.; JUMP, D. B. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity corrects dietary fat-induced hyperglycemia in obese C57BL/6J mice. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 9, p. 2642–54, set. 2010.

TSENG, P.-H. et al. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. **Nature immunology**, v. 11, n. 1, p. 70–5, jan. 2010.

VALLABHAPURAPU, S. et al. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- κ B signaling. **Nature immunology**, v. 9, n. 12, p. 1364–70, dez. 2008.

VALVERDE, A. M. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes. **Diabetes**, v. 52, n. 9, p. 2239–48, set. 2003.

VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; SAAD, M. J. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota and metabolic inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 3, p. 245–271, 2015.

VINCE, J. E. et al. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis. **Cell**, v. 131, n. 4, p. 682–93, 16 nov. 2007.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WEISBERG, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 115–124, 4 jan. 2006.

XIAO, G.; HARHAJ, E. W.; SUN, S. C. NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B p100. **Molecular cell**, v. 7, n. 2, p. 401–9, fev. 2001.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821–30, dez. 2003.

XU, Y.; CHENG, G.; BALTIMORE, D. Targeted Disruption of TRAF3 Leads to Postnatal Lethality and Defective T-Dependent Immune Responses. **Immunity**, v. 5, n. 5, p. 407–415, nov. 1996.

ZARNEGAR, B. et al. Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 9, p. 3503–3508, 2008a.

ZARNEGAR, B. J. et al. Noncanonical NF-kB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. **Nature Immunology**, v. 9, n. 12, p. 1371–1378, 9 dez. 2008b.

ZHANG, X. et al. Role of TLR4-Mediated PI3K/AKT/GSK-3 β Signaling Pathway in Apoptosis of Rat Hepatocytes. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

ANEXOS

Métodos Suplementares

Avaliação da expressão proteica por Imunofluorescência

Células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de cultivo contendo ao fundo lamínulas estéreis. Após aderência, as células foram transfectadas e/ou tratadas, conforme o protocolo descrito no artigo científico originado desta dissertação. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3x com PBS e as células aderidas foram fixadas em metanol gelado (-20°C) por 30 minutos. Após fixação, as células foram bloqueadas com BSA 3% e Triton 0,6% em PBS e incubadas durante a noite com anticorpo primário anti-NIK (SC-7211, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1:500, seguido pelo anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 488 (Abcam, Cambridge, MA) 1:4000, durante 90 minutos. As lamínulas foram montadas com Vectashield (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, 94010) contendo DAPI. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência Leica DMI 4000B em aumento final de 200x.

Electroforese em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose foi realizada utilizando-se uma concentração de 0,8% de agarose (Invitrogen) em tampão Tris-EDTA. Os fragmentos de DNA foram corados com SYBR® Safe DNA (Invitrogen), expostos à luz UV e visualizados em um transluminador.

Transfecção com plasmídeo

Vetores plasmídeos NIK, NIK (KA) e vetor vazio (pRK5) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Rui Liangyou, da University of Michigan Medical School - USA. As células RAW 264.7, com 70% de confluência, foram transfectadas com 1 µg de DNA plasmidial, utilizando Lipofectamina Reagent (Life Technologies) e Plus Reagent (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fornecedor, durante 36 horas, para superexpressar ou inibir NIK.

Figuras Suplementares

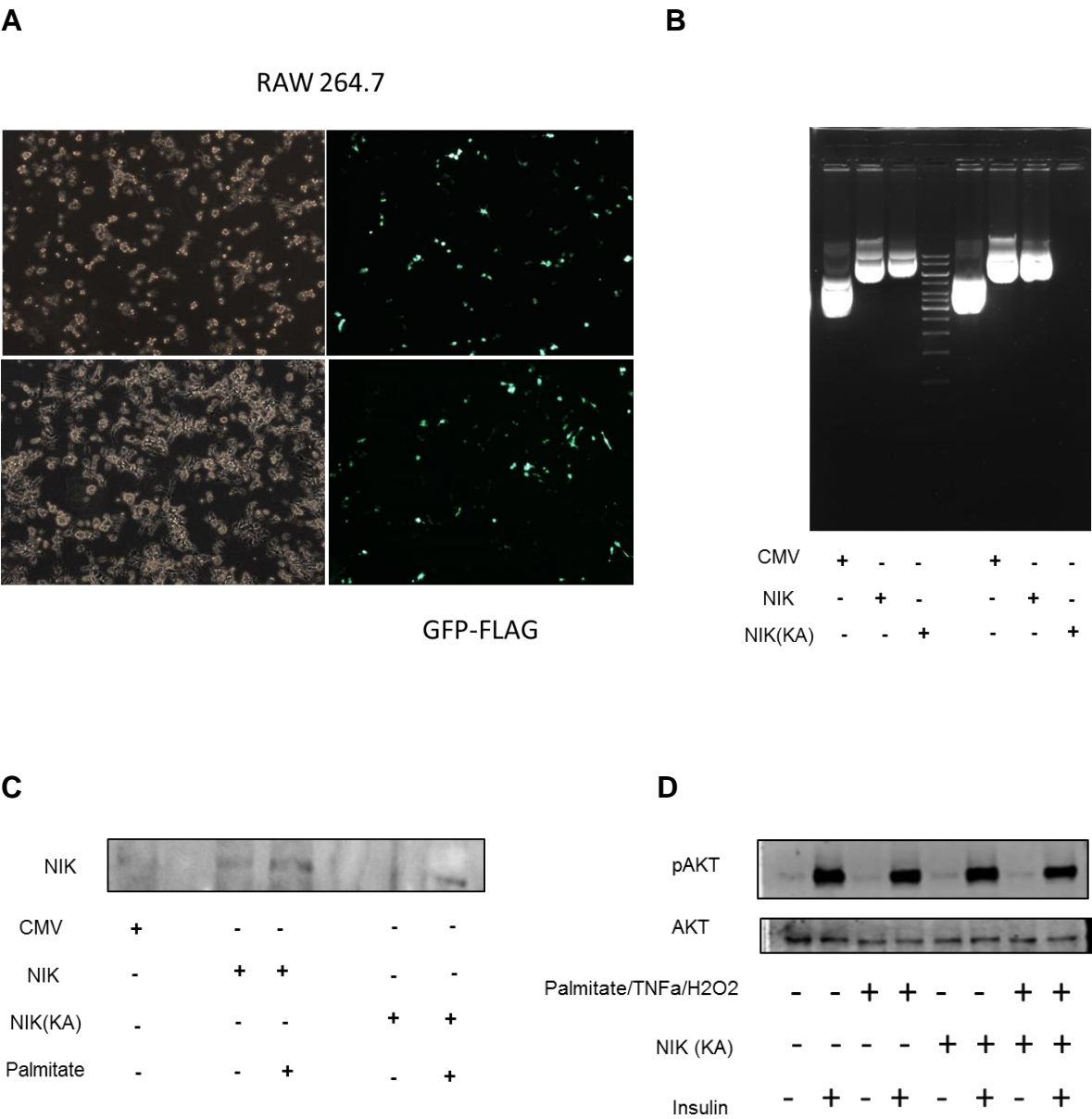


Figura Suplementar 1 - Testes com Vetor Plasmidial FLAG-GFP, pRK5, NIK e NIK(KA) para superexpressão gênica

A: Células RAW 264.7 foram transfectadas com 1 ug do plasmídeo FLAG-GFP para avaliação da eficiência de transfecção do plasmídeo em macrófagos. As células foram transfectadas por 3 horas e, em seguida, o meio sem soro contendo plasmídeo foi substituído por meio de manutenção com soro. Após 24hs (acima) e

48hs (abaixo) da transfecção, as células foram fotografadas para detecção da incorporação do gene transfectado nas células. A fluorescência verde emitida pelo peptídeo GFP foi detectada por microscópio de imunofluorescência. **B:** 1ug (esquerda) e 1,5ug (direita) de DNA plasmideal para pRK5, NIK e NIK(KA) foram aplicados em gel de agarose a fim de conferir a integridade do vetor e a presença do inserto. O teste foi realizado por eletroforese em gel de agarose (0,8%). **C:** Expressão da proteína NIK em macrófagos após transfecção com plasmídeo para pRK5, NIK e NIK(KA) após 48hs, pela técnica de Western blott. Os experimentos iniciais foram realizados com o intuito de padronizar a técnica de transfecção de células de macrófagos para posterior análise dos seus efeitos sobre a sinalização da insulina em hepatócitos. Pela figura é possível observar que a transfecção e/ou expressão de NIK não foi eficiente. **D:** Avaliação da fosforilação de AKT em hepatócitos (Linhagem Hepa1c1c7) tratados com meio condicionado proveniente do tratamento de macrófagos (RAW264.7) com palmitato (100uM), TNF- α (10ng/mL) e H₂O₂ (100nM) por 3 hs e transfectados com plasmídeo para NIK(KA) por 48hs (1ug/well).

Os resultados mostram que não houve diferença na fosforilação de AKT nas células transfectadas com NIK mutante, comparadas às células transfectadas apenas com vetor vazio, outro indício de problemas na técnica de transfecção que precisa ser refinada.

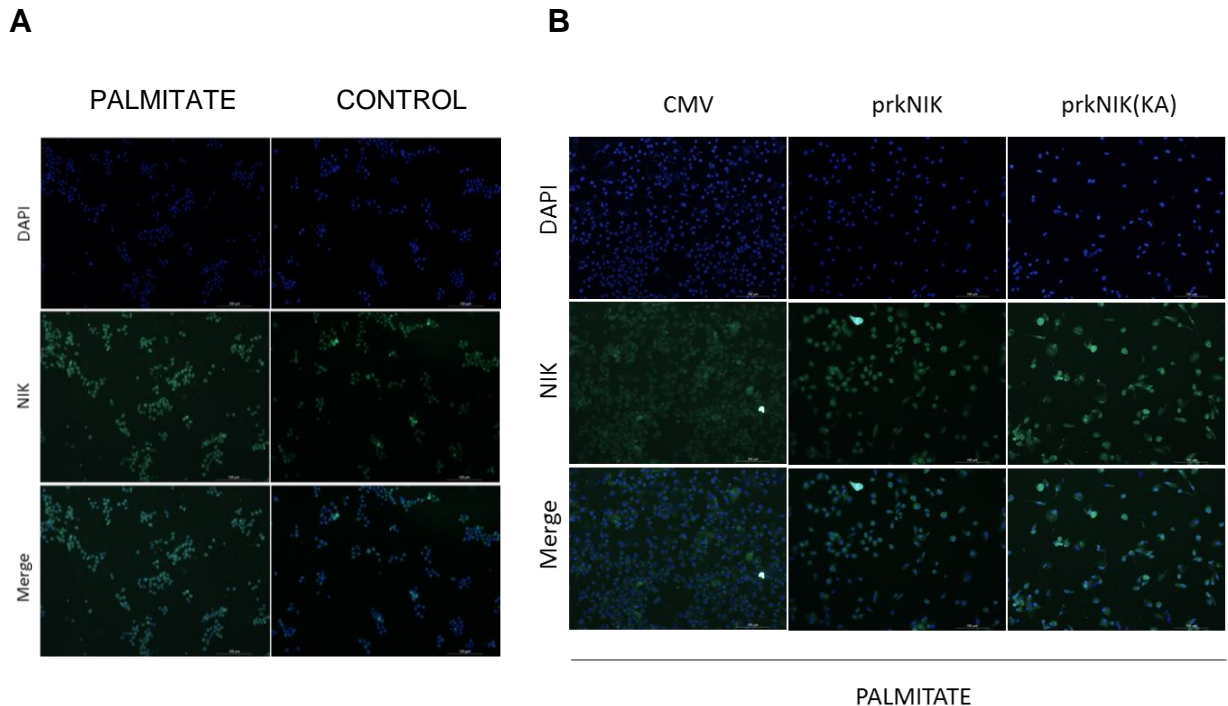


Figura Suplementar 2 – Avaliação da proteína NIK por Imunofluorescência.

A: Macrófagos (Linhagem RAW 264.7) foram tratados com palmitato (500uM) por 3hs, como descrito no protocolo experimental, e avaliados quanto à expressão de NIK por imunofluorescência (em verde). **B:** Macrófagos (Linhagem RAW 264.7) foram transfectados com plasmídeo para NIK, NIK(KA) e pRK5 vazio por 48hs (1ug/well) e tratados com palmitato (500uM) por 3hs. Após o tratamento e transfecção, a expressão de NIK foi avaliada por imunofluorescência (em verde). Anticorpo policlonal de coelho anti-NIK foi utilizado, conforme descrito nos Métodos Suplementares e os núcleos foram corados com DAPI.

Os resultados mostram um aumento de NIK em células tratadas com palmitato e em células transfectadas com prkNIK e prkNIK(KA), quando comparadas aos seus respectivos controles. Entretanto, as imagens apresentam *background*, sendo necessário, portanto, um refinamento da técnica para confirmação dos resultados.